

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der
Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss einer intravenösen Bolusapplikation versus einer
Infusionstherapie von 1%, 2% und 3% Taurolidinlösung in der
konventionellen Chirurgie auf das intra- und extraperitoneale
Tumorstadium bei Ratten.

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Marco Schönbeck

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. A. Jacobi
 2. Priv.-Doz. Dr. med. M. Pross
 3. Prof. Dr. med. L. Krähenbühl

Datum der Promotion: 27.03.06

Zusammenfassung

Hintergrund: Experimentelle Studien konnten zeigen, dass Taurolidin intraperitoneales Tumorwachstum durch lokale intraperitoneale Applikation reduzieren kann. Erste Studien zur tumorstatischen Wirksamkeit nach systemischer Bolus-Applikation zeigten keinen Effekt auf das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum. In einem neuen Experiment wurde die Wirkung einer einwöchigen intermittierenden Therapie versus einer Bolus-Therapie mit steigenden Konzentration von Taurolidin bis 3% auf das intraperitoneale und subkutane Tumorwachstum untersucht.

Methoden: 80 Ratten (BD IX) wurden einer medianen Laparotomie unterzogen. Anschließend wurden 2×10^4 syngenetische Adenokarzinomzellen (DHD/K12/TRb) intraperitoneal und subkutan am Rücken instilliert. Die Tiere wurden in acht Gruppen randomisiert. Vier Gruppen erhielten postoperativ eine intravenöse (iv) Bolustherapie (Taurolidin 1%, 2%, 3%, Ringer-Lösung), vier Gruppen erhielten die Therapie über eine Woche intermittierend viermal täglich über ein iv Port-System. Nach vier Wochen erfolgte die Obduktion und Auswertung des Tumorwachstums hinsichtlich Tumorgewicht und Anzahl der Tumorknoten.

Ergebnisse: Die Anzahl der subkutanen Tumorknoten war unter 3% Taurolidin gegenüber der Kontrollgruppe reduziert ($p=0,035$). Darüberhinaus war ein Trend der Reduktion des subkutanen Tumorgewichtes unter steigender Taurolidinkonzentration zu verzeichnen ($p=0,048$).

Diskussion: Nur die Langzeittherapie über eine Woche mit 3% Taurolidin-Lösung konnte eine diskrete subkutane Tumorreduktion bewirken. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen traten bis auf passagäre vagotone Wirkungen bei zu schneller Applikation nicht auf. Schnelle Injektionen sollten vermieden werden. Die Ergebnisse führen über zu weiteren Studien, die die Wirksamkeit von systemischer Applikation an etablierten, vaskularisierten Tumoren untersuchen.

Taurolidin, Tumor, intravenös, 3%

Abstract

Background: Experimental studies have shown that taurolidine suppresses intraperitoneal tumor growth following local application in rats. In opposite, a single intravenous therapy affected neither intraperitoneal nor subcutaneous growth of malignancies. Thus, an intravenous bolus and long term therapy with 1%, 2% and 3% taurolidine was investigated in rats with intraperitoneal and subcutaneous tumor load.

Methods: At the beginning of the operation 10,000 colon adenocarcinoma cells (DHD/K12/TRb) were applied subcutaneously at the back of the rats. Then the animals (n=80, BD IX rats) were randomized into eight groups and underwent a standardized 4 cm midline laparotomy for 30 minutes. At the end of the operation a bolus (1 ml Ringer's solution) versus a long term intravenous therapy (7 days, eight-hourly 1 ml 1%, 2%, or 3% taurolidine) were performed. For long term therapy a jugularis vein port catheter system was placed and left for one week. The influences on subcutaneous tumor growth, animal growth, general side effects and leukocyte granulocyte counts were analyzed. Total tumor weights were determined four weeks after cell application.

Results: The metastatic (subcutaneous) tumor growth showed a dose-dependent reduction of tumor weight ($p=0.048$) under long term therapy with statistical significance in solid tumor counts ($p=0,035$). A slight and temporary depression in animal growth was observed only in long term therapy groups. Independent of the therapeutic agents and the application forms, the operation itself caused a slight leukopenia shortly after the operation compensated by a moderate leukocytosis in the following course. Fast injections of taurolidine led to temporary reduction of breathing rate.

Conclusions: Only the intravenous long term therapy of 3% taurolidine led to a slight downregulation in metastatic (subcutaneous) tumor growth. The slight changes of leukocyte counts were not affected by taurolidine. Fast injections have to be avoided. The findings prompted us to start new experiments to determine the influence of increasing doses of taurolidine on progressive tumor growth in rats.

taurolidine, tumor, intravenous, 3%

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielstellung	6
3	Methodik	8
3.1	Die Tierhaltung und die Tierpflege	8
3.2	Die Zelllinie	8
3.3	Das Studiendesign	9
3.3.1	Übersicht, Randomisierung, Dokumentation	9
3.3.2	Die Operationsmethodik	11
3.4	Die intravenöse Therapie mit 1%, 2% und 3% Taurolidin bei Ratten	13
3.5	Die Bestimmung des Differentialblutbildes	13
3.6	Die Bestimmung des intraperitonealen und subkutanen Tumorgewichtes	14
3.7	Die Dokumentation der Daten und die statistische Auswertung	15
4	Ergebnisse	16
4.1	Das subkutane Tumorwachstum	17
4.2	Das intraperitoneale Tumorwachstum	19
4.3	Das periphere Blutbild	21
4.3.1	Die Leukozyten	22
4.3.2	Die Lymphozyten	23
4.3.3	Die Monozyten	25
4.3.4	Die Granulozyten	26
4.3.5	Die eosinophilen Granulozyten und Erythroblasten	26
4.3.6	Das Differentialblutbild im Überblick	27

4.4	Das Körpergewicht der Tiere	27
5	Diskussion	30
5.1	Taurolidin in der intravenösen Anwendung	30
5.2	Taurolidin in der Tumorthherapie - ein Überblick über die aktuelle Literatur	34
5.3	Taurolidin induziert den programmierten Zelltod	39
5.4	Taurolidin als antiadhärente Substanz	42
5.5	Taurolidin neutralisiert bakterielles Endotoxin (LPS) - als tumorproliferative Substanz	46
5.6	Taurolidin als Modulator der Interaktionen von Zytokinen	48
5.7	Intrazelluläre Wirkmechanismen von Taurolidin	50
6	Zusammenfassung und Ausblick	51

1 Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist bei steigender Inzidenz eine der häufigsten malignen Erkrankungen der westlichen Welt. Die Inzidenz liegt in Mitteleuropa derzeit bei 20-24 Fällen/100.000 Einwohner/Jahr. Insgesamt macht die Erkrankung trotz verbesserten Therapieregimes immer noch 12-15% der gesamten Krebsmortalität aus [1].

In der Therapie des kolorektalen Karzinoms steht die chirurgische Resektion des Tumors im Vordergrund. Für den Sonderfall des Rektumkarzinoms, ist die Prognoseverbesserung durch eine neoadjuvante Radiochemotherapie belegt. Darüber hinaus erfolgt bei kolorektalen Tumoren des UICC-Stadiums III und IV nach R0-Resektion eine adjuvante Chemotherapie, um lokoregionären Rezidiven durch verbliebene, makroskopisch nicht sichtbare Tumorzellen vorzubeugen [2]. Entsprechend den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft besteht das aktuelle first line - Therapieregime aus einer sechsmonatigen Gabe der Kombination von 5-Fluorouracil (5-FU), einem Pyrimidinantagonisten, und Tetrahydrofolsäure. Auch bei nicht resektablen Tumoren kann die palliative Behandlung nach einem 5-FU und Leukovorin enthaltendem Protokoll in Kombination mit einer symptomorientierten chirurgischen Therapie durchgeführt werden.

Entsprechend dem Wirkmechanismus der Antimetabolit-Zytostatika haben Substanzen wie 5-FU zwar vergleichsweise gute Verträglichkeit, dennoch ist die Knochenmarkstoxizität häufig dosislimitierend. Darüber hinaus sind häufige unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) wie Mukositiden (Stomatitis, Ösophagitis, Enteritis) Gründe für eine Dosisbegrenzung. Die Entwicklung neuer potenter Chemotherapeutika mit geringem Nebenwirkungsspektrum ist derzeit wichtiges Ziel in der Krebsforschung.

Von entscheidender Bedeutung für die chirurgische Therapie maligner Tumoren ist die Vermeidung lokoregionärer Rezidiverkrankungen. Nach Einführung der Laparoskopietechnik für die Resektionen maligner Tumoren in Rahmen von Studien häuften sich die Fallberichte über ein erhöhtes Auftreten von lokalen Rezidiven an den Trokar-Eintrittsstellen [3,4,5,6]. Der Mechanismus der Zellverschleppung ist hauptsächlich durch mechanische Manipulation am Tumor bedingt. Als weiterer ursächlicher Faktor konnte die Verletzung der Peritonealoberfläche durch Trokare etc. erkannt werden [7]. Tumorzellen haben die Potenz zu adhären, zu emigrieren

und Metastasen zu bilden [8]. Hierbei spielt auch Neovaskularisation, insbesondere ab einer Tumorknotengröße von 2-3 mm³ eine entscheidende Rolle für die weitere Entwicklung der Metastase [9]. Die oben genannten Faktoren werden auf vielfältige Weise durch chirurgische Interventionen alterniert. So beeinflussen Mediatoren, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren, die durch das Gewebetrauma freigesetzt werden, die Vitalität und das Adhäsionsvermögen der Tumorzellen [10]. Weitere Einflussmöglichkeiten bestehen durch eine lokale Azidose und eine Erhöhung des intraabdominellen Druckes durch Kohlenstoffdioxidinsufflation und durch eine lokale Inflammation aufgrund der Translokation von Darmflora. Insbesondere die Verletzung der peritonealen Oberfläche führt zu einer erhöhten Adhärenz von Zellen und somit zu einer erhöhten Inzidenz von Metastasen [11].

Trokarmetastasen, lokoregionäre Rezidive nach chirurgischen Eingriffen und schlecht verträgliche Chemotherapeutika begründen die Suche nach nebenwirkungsarmen Medikamenten, die darüber hinaus auch antiadhärente und zytokinmodulierende Eigenschaften besitzen. Diese Eigenschaften könnte Taurolidin (TRD) erfüllen.

Taurolidin (Bis - (1,1 dioxoperhydro-1,2,4-thiadiziny-4) Methan), synthetisiert aus der Amino-sulfonsäure Taurin, ist seit 1975 im Einsatz als potentes antimikrobielles Chemotherapeutikum in der Therapie schwerer chirurgischer Infektionen (Peritonitis, Sepsis) [12]. Als kleines unpolares Molekül (Molekulargewicht: 284,37 g/mol) kann es gut peritoneal resorbiert werden und Zellwände durchdringen. Die Metabolite Taurultam und Methyltaurultam sind Methylolgruppen-Donatoren. Diese aktiven Methylolgruppen vernetzen chemisch irreversibel Zellwandoberflächenproteine der Bakterien, inaktivieren deren Endo- und Exotoxine und verhindern die bakterielle Adhäsion durch Methylierung der extrazellulären Matrix [12,13]. Diese Wirkungsweise bedingt einen breiten Einsatz im Spektrum der aeroben und anaeroben Bakterien und filamentösen Fungi [12,14,15,16,17,18].

Bereits 1990 führten erste Beobachtungen in vitro und am Tiermodell zu der These, dass Taurolidin auch die Adhärenz freier Tumorzellen hemmen und das Auftreten von Lokal-Rezidiven verringern kann. Daraufhin erfolgte sowohl in vitro [19,20,21,22,23,24,25], als auch in vivo am Modell der Ratte [20,23,24,25,26,27], der Maus [22,28,29] und am syrischen Goldhamster [30] umfangreiche Grundlagenforschung zu diesem Thema.

Zunächst wurden die Erfolge den antiadhäsiven Eigenschaften von Taurolidin zugeschrieben. Ausgehend von der These, dass das chirurgische Trauma an der Peritonealoberfläche ursächlich zur Metastasierung beiträgt, konnte schon in den 80er Jahren durch Bindung der extrazellulären Matrix das Auftreten von Metastasen experimentell reduziert werden [31,32]. Auch van den Tol konnte zeigen, dass eine Reduktion des peritonealen Traumas eine reduzierte Inzidenz von Metastasen in der Tumorchirurgie bewirkt [33]. Jacobi et al. konnten in einem Kolon-Karzinom - Modell der Ratte zeigen, dass eine intraperitoneale Lavage mit 0,5% Taurolidin-Lösung das Tumorgewicht und die Inzidenz von Port-site-Metastasen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Die Kombination mit der antiadhärenten Substanz Heparin ergab einen synergistischen Effekt auf das Tumorwachstum [27]. Ein ähnliches Ergebnis fanden Volz et al. an einem Ovarial-Karzinom - Modell der Maus: Eine frühe peritoneale Lavage mit der Kombination aus 0,5% Taurolidin und Heparin führte zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit [34].

Taurolidin wurde in vitro an unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht. So führten Calabresi et al. erfolgreiche in vitro Versuche mit Melanom-, Glioblastomzellen, sowie Zellreihen von malignen Tumoren des Ovars, der Lunge und Prostata durch [29]. Die experimentell ermittelte IC₅₀ betrug 10-35 µM - ein Tausendstel der minimalen Hemmkonzentration für Bakterien. Von anderen Arbeitsgruppen erfolgten Untersuchungen an humanen Leukämiezellen [19,22], Gallenblasenkarzinom [23], neuronalen Tumoren [21,22] und vitalem Knochenmark der Maus [22]. Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass Taurolidin humane Leukämiezellen selektiv hemmt und normale vitale Knochenmarkzellen der Maus im Gegensatz zu den Leukämiezellen nach der Inkubation mit Taurolidin und Reinigung wieder zu proliferieren beginnen [22]. Dies könnte ein weiteres potientiellles Anwendungsgebiet in der Hämatookologie eröffnen.

Calabresi et al. fanden Hinweise auf Taurolidin-induzierte-Apoptose in einer Ovarialtumor-Zelllinie (PA-1). So ließen sich nach Exposition mit Taurolidin eine dosisabhängige Spaltung von PARP (Apoptosemarker) [19,29] und positive Befunde anderer Apoptosemarker nachweisen [29]. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen am vitalen Knochenmark [22] konnten auch an murinen Fibroblasten nur verminderte Wirkungen festgestellt werden: Nach einem reversiblen Wachstumsstillstand traten nur bei einem geringen Anteil der Zellen

Apoptosezeichen auf. Bei den Ovarialtumor-Zellen war dieser Apoptoseeffekt deutlicher. Der zelluläre Hintergrund dieser scheinbar tumorzellspezifischen Apoptoseinduktion bleibt zunächst noch unklar.

Eine irische Arbeitsgruppe um Redmond konnte an DHD/K12/TRb - Kolonkarzinomzellen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigen: In vitro nahm die Apoptoserate mit steigender Konzentration ab (Wirkungsmaximum bei 5 µg/ml). Mit zunehmender Konzentration nahm hingegen die Rate von Zelluntergängen durch Nekrose zu (Wirkungsmaximum bei 25 µg/ml). Die Proliferationsrate wurde jedoch unabhängig von der Konzentration gehemmt. Auch andere Arbeitsgruppen konnten Hinweise für Apoptose finden [21,35], die genauen intrazellulären Mechanismen bleiben jedoch bisher unklar und sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung.

Eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese von Tumorerkrankungen nehmen Zytokine ein. So stimulieren proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 β und TNF- α zum einen Abwehrzellen, sind andererseits jedoch auch Wachstumsfaktoren für Tumorzellen. So stellt z.B. in der onkologischen Abdominalchirurgie die perioperative Inflamationsreaktion, bedingt durch chirurgisches Trauma und lokale Bakterientranslokation, ein Bindeglied zwischen Entzündung und Metastasenbildung durch verschleppte Tumorzellen dar. Die Rezidiv-protectiven Effekte von Taurolidin in lokaler intraperitonealer Anwendung sind so zum Teil durch Neutralisation der bakteriellen Endotoxine und somit verminderter lokaler Inflammation zu erklären [20,36].

Von größerer Bedeutung für die Suppression von lokalen Rezidiven könnte jedoch die direkte Wirkung von Taurolidin auf Makrophagen sein. Peritonealmakrophagen sind essentieller Teil der intraperitonealen unspezifisch-zellulären Abwehr. Sie sezernieren eine Reihe von Zytokinen, die intraperitoneal wesentlich höhere Konzentrationen erreichen als im Serum. Experimentell konnte eine signifikante Hemmung der IL-1 β - Freisetzung durch Taurolidin nachgewiesen werden [25]. Nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS, bakterielles Endotoxin) und Inkubation mit Taurolidin wurde die IL-1 β - Produktion durch die Makrophagen unter die Nachweisgrenze supprimiert. Auch Bedrosian et al. untersuchten die Potenz von Taurolidin, an durch LPS stimulierten Makrophagen den Anstieg von TNF- α und IL-1 β zu verhindern. Das Ergebnis der Untersuchungen zeigte, dass die Konzentration von 40-100 µg/ml eine 80-90% Reduktion der totalen IL-1 β und TNF- α Sekretion

ergab. Überraschenderweise war dieser Effekt reversibel, so waren die Zellen nach Entfernung des Taurolidins wieder zur Produktion von Zytokinen in der Lage [37].

Neben zahlreichen in vitro Untersuchungen liegen mehrere in vivo Modelle vor, die die antineoplastische Wirkung von Taurolidin belegen. Jacobi et al. konnten eine intraperitoneale Wirksamkeit an einem Kolonkarzinommodell (DHD/K12/TRb) an BD-IX Ratten bei lokaler Applikation zeigen. In verschiedenen Studien [23,24,25,26,27] traten unter Taurolidin - Therapie signifikante Reduktionen der Tumorlast und der Inzidenz von lokalen- und Port-Site-Metastasen auf. Die Reduktion von Port-Site-Metastasen konnte darüber hinaus auch noch in einem Pankreaskarzinommodell am syrischen Goldhamster gezeigt werden [30]. Da Costa et al. konnten an Mäusen mit B16 Melanomzellen subkutan (sc), intralinal und intravenös (iv) ein signifikant verlängertes Überleben und eine geringere Inzidenz von Metastasen in der Taurolidingruppe (2% intraperitoneal (ip)) gegenüber der Kontrollgruppe (NaCl ip) nachweisen [28]. Calabresi et al. untersuchten Mäuse mit intraperitonealem Ovarialkarzinom (SKOV-3) und konnten unter lokaler Therapie mit Taurolidin sowohl die Tumorinzidenz, als auch das Tumorgewicht reduzieren.

Mit dem aktuellen Stand der Forschung ist Taurolidin eine nebenwirkungsarme Substanz mit über 20-jähriger Erfahrung im klinischen Einsatz am Menschen. Die Wirkung als antineoplastisches Agens in der lokalen Anwendung ist tierexperimentell belegt [20,23,24,25,26,27,28,29,30,34,38,39,40], um eine Untersuchung am Menschen in Form von prospektiv randomisierten Studien zu rechtfertigen. Die alleinige lokale Anwendung bringt im klinischen Alltag jedoch erhebliche Probleme mit sich. So kann eine protrahierte intraperitoneale Applikation aufgrund starker Schmerzreize nur in Narkose über Spüldrainagen oder im Rahmen einer invasiven 2nd look Operation durchgeführt werden. [15,36]. Daher steht die Prüfung auf Sicherheit und Toxizität einer *systemischen Anwendung* als adjuvantes Chemotherapeutikum im Mittelpunkt dieser Studie. In der Indikation als antimikrobielles Chemotherapeutikum wurde Taurolidin bei Sepsis schon seit langem auch intravenös verabreicht. Dabei wurden gute Erfahrungen mit geringer Toxizität auch bei hohen Dosierungen gemacht. Die experimentelle LD50 liegt bei über 1000 mg/kg KG [12].

Erste Versuche unserer Arbeitsgruppe zum Vergleich der intraperitonealen vs. der systemischen Bolusgabe von 0,5% Taurolidin am Kolonkarzinom-Modell der Ratte

ließen zunächst keine systemische antineoplastische Wirksamkeit erkennen [26]. Möglicherweise ist bei einmaliger intravenöser Gabe von 1 ml 0,5% Taurolidin die Konzentration am Wirkort zu gering. Weberschock et al. konnten jedoch an einem validierten Modell an der Ratte [41] zeigen, dass 2% Taurolidin iv im Gegensatz zu 0,5% Taurolidin iv die Tumorausbreitung reduzieren konnte [42]. Gegenstand dieser Studie soll nun die Untersuchung einer einmaligen versus einwöchigen intravenösen Infusionstherapie mit steigender Konzentration auf das intraperitoneale und subkutane Tumorwachstum sein.

2 Zielstellung

In einem Tierexperiment soll am Modell der Ratte (BD-IX) die Substanz Taurolidin auf ihre tumorsupprimierenden Eigenschaften beim Kolonkarzinom untersucht werden. Es soll gezeigt werden, ob die positiven Ergebnisse einer *lokalen* Taurolidin - Therapie auf eine *systemische* Applikationsform übertragbar sind [26].

Hierzu wird ein bewährtes und in mehreren Vorexperimenten [20,23,24,25,26,27] validiertes Tumormodell verwendet: In einem Tierexperiment wird die Freisetzung vitaler Tumorzellen durch einen onkochirurgischen Eingriff (z.B. Kolonteilresektion bei Kolonkarzinom) simuliert. Hierzu erhalten 80 Ratten nach medianer Laparatomie eine sterile Injektion von 20.000 syngenetischen Kolonkarzinomzellen (DHD/K12/TRb) sowohl intraperitoneal, als auch subkutan am Rücken. Die intraperitonealen Zellen simulieren vitale Tumorzellen, die bei einer Resektion durch Manipulation am Tumor mobilisiert werden könnten. Durch das subkutane Tumorzelldepot am Rücken wird eine Filia simuliert.

Die systemische Therapie wird nach Randomisierung bei der Hälfte der Tiere (n=40) einmalig unmittelbar postoperativ über die Vena dorsalis penis vorgenommen (Bolustherapie). Die verbleibenden 40 Tiere werden 7 Tage lang 4x täglich über einen Port in der Vena jugularis interna infundiert (intermittierende Therapie). Zur Untersuchung der Abhängigkeit zwischen der Taurolidin-Konzentration und dem Tumorwachstum wird den Tieren Taurolidin unterschiedlicher Konzentration (1%, 2%, 3%) appliziert und anschließend das gesamte intraperitoneale und subkutane Tumorgewicht mit dem der Kontrollgruppe verglichen.

Der vorliegende Tierversuch evaluiert den Einfluss der Konzentration, sowie der Wirkdauer von Taurolidin auf zwei unterschiedliche Kompartimente (subkutan und

intraperitoneal). Darüber hinaus dient der Versuch der Erfassung und Dokumentation von unerwünschten Nebenwirkungen der konzentrierten systemischen Taurolidin-Therapie.

3 Methodik

3.1 Die Tierhaltung und die Tierpflege

Für die Versuche wurden insgesamt 80 männliche Ratten der Rasse BD IX (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden jeweils 14 Tage vor dem geplanten Eingriff in einem klimatisierten und eigens für Kleintiere vorgesehenen Raum (Temperatur 22-24 °C, Luftfeuchtigkeit 50-60%, automatisierter 12h Licht-/Dunkelzyklus) untergebracht. Somit wurde den Tieren eine einwöchige Eingewöhnungsphase vor der ersten Intervention (Blutentnahme) gewährt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standard-Laborfutter. Die Pflege und Versorgung der Tiere wurde durch geschultes Fachpersonal sichergestellt.

24h vor der Operation wurden die Tiere bei freiem Zugang zu Wasser nüchtern belassen. Postoperativ wurden die Tiere für drei Stunden engmaschig überwacht. Die Operationen wurden in gewichtsadaptierter Vollnarkose (Pentobarbital intraperitoneal) durchgeführt. Der postoperative Wundschmerz wurde intraoperativ durch Tramadol ip gelindert.

Blutentnahmen wurden in einer kurzzeitigen Ätherinhalationsnarkose durchgeführt. Im Rahmen der Blutentnahmen erfolgten Gewichtsbestimmungen, die das Wachstum der Tiere ermittelten. Nach 28 Tagen wurden die Tiere mittels Kohlenstoffdioxidintoxikation getötet und durch einen geblindeten Untersucher obduziert. Die Lagerung der Kadaver erfolgte bis zur sachgerechten Abholung der Tierkörperverwertung bei -21°C.

3.2 Die Zelllinie

Als Tumorzellmodell wurden syngenetische Kolon - Karzinom - Zellen (DHD/K12/TRb) (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, United Kingdom) der BD IX Ratte verwendet. Die Zellen wurden in Dulbeccos MEM (Biochrom, Deutschland) und HAMs F10-Medium (Biochrom, Deutschland) 1:1 mit 10%igem fetalen Rinderserum (Dibco BRL, Deutschland), 2 mmol/l Glutamin (Biochrom, Deutschland) und Penicillin-Streptomycin 1000 IU/ml (Gibco, Deutschland) kultiviert.

Zur Herstellung der gewünschten Tumorzellkonzentration erfolgte eine fünfminütige Passagierung (Trypsinierung) bei 37°C. Nach der anschließenden Neutralisation des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Vollmedium wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert und die Zellpellets in 10 ml Vollmedium resuspendiert.

Die Zellzählung und Vitalitätsprüfung wurden in der Neubauer-Zählkammer (0.1 µl) nach der Trypan-Blau-Methode durchgeführt. Dabei wurden die Zellsuspension sowie das Trypan-Blau in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und unter dem Mikroskop ausgezählt. Gleichzeitig war eine Einschätzung der Rate an avitalen Zellen möglich. Entsprechend der Zellzahl erfolgte die Verdünnung der Suspension mit Fertigmedium ohne fetales Rinderserum, um Fremdanigene zu vermeiden und die Abfüllung von jeweils 1 ml in Eppendorfgefäße. Die Gefäße verblieben im Inkubator und wurden direkt vor der Applikation vortexbehandelt und resuspendiert.

3.3 Das Studiendesign

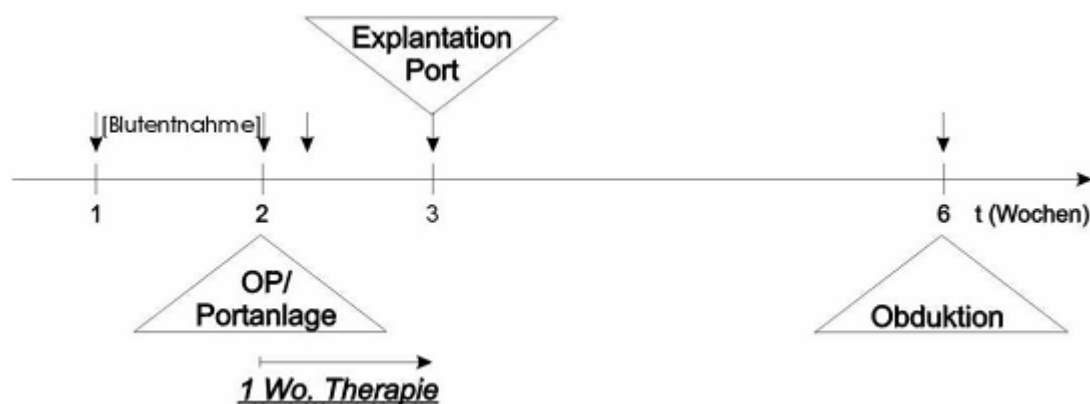


Abb. 1: Studiendesign schematisch

3.3.1 Übersicht, Randomisierung, Dokumentation

Für die Untersuchung der Abhängigkeit des Tumorwachstums von der Konzentration des applizierten Taurolidins wurde es in den Konzentrationen 1%, 2%, 3% intravenös appliziert. Desweiteren wurden in dem Tierexperiment die beiden Applikationsformen „intermittierende Therapie“ und „Bolustherapie“ gegenübergestellt. Die Kodierung in die einzelnen Versuchsreihen gestaltete sich wie folgt:

Gruppe A (intermittierende Infusionstherapie über 7 Tage - 4x täglich)

A0 - Kontrollgruppe (Therapie mit Ringer Lactat)

A1 - Taurolidin 1% entspricht 160 mg/kg KG/Tag

A2 - Taurolidin 2% entspricht 320 mg/kg KG/Tag

A3 - Taurolidin 3% entspricht 480 mg/kg KG/Tag¹

Gruppe B (Bolustherapie - einmalig direkt postoperativ)

B0 - Kontrollgruppe (Therapie mit Ringer Lactat)

B1 - Taurolidin 1% entspricht 40 mg/kg KG

B2 - Taurolidin 2% entspricht 80 mg/kg KG

B3 - Taurolidin 3% entspricht 120 mg/kg KG

Zwei Wochen präoperativ erfolgte die Anlieferung der Tiere, die sich 7 Tage an die Bedingungen und den Tag / Nacht - Rhythmus gewöhnen konnten. Eine Woche präoperativ erfolgte die erste Blutentnahme, Körpergewichtsmessung und Randomisierung der Tiere in 8 Gruppen (n=10). Die Markierung der Tiere erfolgte durch Kodierung über gestanzte Ohrlöcher im Rahmen der Kurznarkose für die Blutentnahme.

Am Tag 14 erfolgte die Operation, Tumorzellapplikation und ggf. Katheterimplantation (Gruppe A). Danach wurden die Tiere wie unter 3.4 beschrieben therapiert. Anschließend (7. postoperativer Tag) wurden die Ports entfernt (siehe 3.3.2.3). Die Obduktion erfolgte am 28. postoperativen Tag (siehe 3.3.2.4).

Zur Evaluation einer möglichen Einflussnahme von Taurolidin auf das Immunsystem wurden zu fünf Zeitpunkten peripher-venöse Blutproben entnommen: 7 Tage präoperativ, 2 Stunden, 2 Tage, 7 Tage und 28 Tage postoperativ (siehe 3.5). Zeitgleich wurde als weiterer Index für mögliche Nebenwirkungen des Taurolidins das Körpergewicht der Tiere bestimmt.

Die Dokumentation der erhobenen Daten erfolgte auf standardisierten und jedem einzelnen Tier zugewiesenen Erfassungsbögen.

¹ Aufgrund von Toxizitätsstudien liegt die LD50 über 1000 mg/kg. Aufgrund der geringen Halbwertszeit sind kumulative Effekte bei 6 stündlicher intermittierender Infusion nicht zu erwarten [12]

3.3.2 Die Operationsmethodik

3.3.2.1 *mediane Laparatomie*

Zur Operation wurden die Tiere mittels intraperitonealer Applikation von 45 mg/kg Körpergewicht (KG) Pentobarbital narkotisiert. Nach Narkoseeintritt wurden sie an Bauch, Rücken und bei Gruppe A - Tieren zur Portimplantation auch rechtsseitig am Hals enthaart und die Hautoberfläche mit Braunol (PVP-Jod - Lösung) steril abgewaschen. Danach erfolgte in Bauchlage die Injektion der Tumorzellsuspension (1 ml mit 2×10^4 , DHD/K12/TRb Zellen). Nach erneuter Desinfektion wurde die Bauchdecke durch eine 4 cm lange mediane Laparatomie eröffnet. Der Darm wurde eventeriert und auf einer sterilen Kompresse gelagert. Nach Antrocknen der Serosa (5 Minuten) wurde der Darm reponiert und die intraperitoneale Tumorzelldosis instilliert.

Am Operationsende erfolgte der Verschluss der Bauchdecke zweischichtig: fortlaufende Naht der Bauchwandmuskulatur mit Vicryl 4/0, sowie fortlaufende Matratzennaht der Haut mit Vicryl 4/0 und versenkten Knoten, damit die Tiere die sichere Naht im Rahmen der Fellpflege nicht gefährden. Um Wundinfektionen zu vermeiden, wurden diese anschließend desinfiziert und mit einem Sprühverband geschützt.

Die Operationszeiten, gemessen vom Hautschnitt bis zum Beginn der Hautnaht, betrugen in allen Gruppen 30 Minuten.

3.3.2.2 *Die Portimplantation*

Die Tiere der Gruppe A erhielten für die Dauer von 7 Tagen einen ROP-3.5H - Port (Norfolk - Access Technologies, Skokie, IL, USA - <http://www.norfolkaccess.com>). Die Implantation erfolgte nach oben beschriebener Vorbereitung in die rechte Vena jugularis interna. Hierzu wurde ein ca. 1 cm langer Hautschnitt vor dem M. sternocleidomastoideus rechts angefertigt. Nach stumpfer subkutaner Präparation einer Hauttasche für den Port wurde die V. jugularis interna aufgesucht und dargestellt. Nach Vorlegen einer Ligatur der proximalen Vene wurde sie zu 2/3 des Durchmessers quer eröffnet. Das Lumen wurde mit einem Introducer aufgesucht und geweitet, so dass der Katheter eingeführt werden konnte und ca. 1 cm vorgeschoben wurde. Die Ligatur wurde befestigt, und die Portkammer wurde in die vorbereitete

Hauttasche geschoben. Nach Prüfung der korrekten Lage und Durchlässigkeit des Katheters erfolgte der Hautverschluss mittels Vicryl 4/0 fortlaufender Naht.

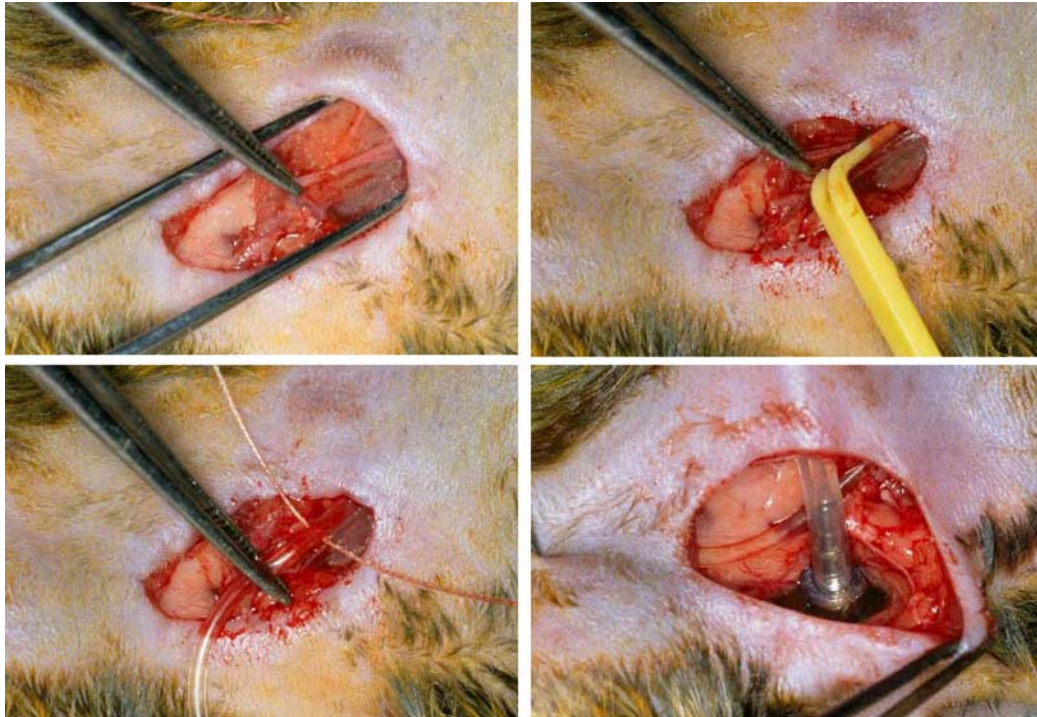


Abb. 2: Die Portimplantation; Bild 1: Darstellen und Eröffnen der V. jugularis interna. Bild 2: Aufsuchen des Gefäßlumens mittels Introducer. Bild 3: Einführen des Ports und Ligatur. Bild 4: subkutane Platzierung der Portkammer

3.3.2.3 Die Portexplantation

Das Entfernen der Katheter (Tiere der Gruppe A) erfolgte nach der letzten Medikation am 7. postoperativen Tag. Hierzu wurden die Tiere analog zu 3.3.2.1 mit Pentobarbital narkotisiert. Nach Desinfektion des OP - Gebietes erfolgte die Wiedereröffnung der vorhandenen Narbe. Mit der Präparierschere wurde das OP-Feld unter Schonung des Katheters erweitert, bis die fibröse Umkapselung des Ports dargestellt werden konnte. Nach Eröffnen derer erfolgte die Mobilisierung und Entfernung des Katheters. Eine Ligatur des proximalen Venenstumpfes erwies sich als unnötig, da keine Blutungen auftraten. Abschließend wurde die Porttasche zur Vermeidung von Infektionen mit verdünnter Braunol-Lösung gespült und ein Debridement der Wundränder vorgenommen. Danach erfolgte der Wundverschluss.

3.3.2.4 Die Obduktion

Am 28. postoperativen Tag, im Anschluss an die 5. Blutentnahme, erfolgte die

Tötung durch Kohlenstoffdioxid. Die Tiere wurden geblendet obduziert und auf subkutanes und intraperitoneales Tumorwachstum untersucht.

Zunächst wurde das Areal um die subkutane Injektion am Rücken der Tiere inspiziert. Hierzu wurden nach Palpation der Region ein querer Schnitt in Höhe der Schulterblätter und dann ein medianer Schnitt bis in Höhe des Os occipitale angelegt. Für die Inspektion des gesamten Bauchraums wurde ein Kreuzschnitt (paramediane und quere Laparatomie) angelegt. Durch die paramediane Schnittführung konnte eine bessere Auswertung der Inzidenz von Inzisionsmetastasen erfolgen. Nach Exploration des Bauchraums wurde der Schnitt auf die Thoraxhöhle erweitert, um evtl. Lungenmetastasen zu erkennen.

Die Tumorknoten wurden vom Bindegewebe streng separiert und nach Lokalisation getrennt erfasst. Darüber hinaus wurden Auffälligkeiten, wie Bridenbildung oder Ascitis o.a. vermerkt.

3.4 Die intravenöse Therapie mit 1%, 2% und 3% Taurolidin bei Ratten

Für das Experiment wurde je 1 ml Taurolidin in den Konzentrationen 1%, 2%, 3% verwendet. Die 2% Lösung wurde von Geistlich Pharma, Wolhusen, Schweiz (Taurolin® 2%) bezogen. Die 1% Lösung wurde durch 1:1 Verdünnung von Taurolin® 2% mit Ringer - Elektrolyt-Lösung hergestellt. 3% Taurolidin - Lösung wurde direkt vor dem Experiment aus der Reinsubstanz (Geistlich Pharma, Wolhusen, Schweiz) steril in unserem Labor hergestellt. Hierzu wurde nach einer Anleitung des Herstellers vorgegangen. Die Lösungen wurden nach 5 Tagen erneuert, da sich die 3% Lösung als instabil erwies. Für die Kontrollgruppen (A0 und B0) wurde Ringer Lactat - Lösung verwendet.

Zur Vermeidung der Thrombosierung der Ports wurde allen Lösungen je 10 IE Heparin/ml beigegeben.

3.5 Die Bestimmung des Differentialblutbildes

Um einen Einfluss von intravenös appliziertem Taurolidin auf die Leukozytenpopulation zu analysieren, erfolgten perioperativ fünf peripher-venöse Blutentnahmen:

- I: 7 Tage präoperativ (Ausgangswerte)
- II: 2 Stunden postoperativ
- III: 2 Tage postoperativ
- IV: 7 Tage postoperativ (Tag der Portexplantation in Gruppe A)
- V: 28 Tage postoperativ (Zeitpunkt der Obduktion)

Zur Blutentnahme wurden die Tiere in einem standardisierten Inhalationsgefäß mit Äther für ca. eine Minute narkotisiert. Jeweils 800 µl Blut wurden mittels einer Glaskapillare aus dem retrobulbären Plexus entnommen und in heparinisierten Eppendorfgefäßen bis zur Weiterverarbeitung bei +4°C gekühlt gelagert. Im Differentialblutbild wurden Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Eosinophile und Erythroblasten (pro 100 Zellen) bestimmt. Zur Bestimmung des Differentialblutbildes wurden Blutausrich angefertigt, nach „Pappenheim“ gefärbt und ausgezählt. Der Blutausrich erfolgte auf einem fettfreien Objektträger. Anschließend wurden die Präparate gefärbt: Zunächst wurden die Blutausrich 3 Minuten in unverdünnter May - Grünwald - Lösung (Eosin-Methylenblau) fixiert, mit gleicher Menge destillierten Wassers verdünnt und 3 Minuten gefärbt und anschließend 15-20 Minuten in verdünnter Giemsa - Gebrauchslösung (Azur-Eosin-Methylenblau) weitergefärbt. Abschließend wurden die Ausrich 2 Minuten mit destilliertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

Die Bestimmung der peripheren Leukozytenzahlen erfolgte nach erythrozytärer Lyse des Vollblutes mit dreiprozentiger Essigsäure (1:1) mittels Neubauer Zählkammer. Die Berechnung der Zellzahlen/µl erfolgte bei bekannten Volumen der Zählkammer (0.1 µl) und Berücksichtigung der Verdünnung (1:20).

Das verbleibende Vollblut wurde zur Separierung des Blutplasmas von den korpuskulären Bestandteilen 10 Minuten bei +4°C zentrifugiert (10.000 rpm) und der Überstand (ca. 270 µl) in drei Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

3.6 Die Bestimmung des intraperitonealen und subkutanen Tumorgewichtes

Die Obduktion der Tiere erfolgte 28 Tage nach Tumorzellapplikation. Die Lokalisation und Anzahl der Tumorknötchen wurde bei der Obduktion durch einen „geblindeten“ Untersucher ermittelt und auf standardisierten Bögen dokumentiert. Unterschieden wurde nach Lokalisation zunächst zwischen subkutanen Metastasen (Rücken) und

abdominellen Metastasen (subkutan, Inzision, Bauchwand, Leber, großes Netz, Magen, kleines Netz, Nieren, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Rektum, kleines Becken).

Die Gewichtsbestimmung der Tumoren der einzelnen Regionen erfolgte mit einer Präzisionswaage (BP 610) der Firma Sartorius (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Anschließend wurde das Material getrennt nach Kompartimenten (sc und ip) in Eppendorfgefäßen separiert und für eine spätere pathologische Aufarbeitung kryokonserviert (-80°C).

3.7 Die Dokumentation der Daten und die statistische Auswertung

Die Tiere wurden vor der ersten Blutentnahme (7 Tage präoperativ) in die einzelnen Versuchsgruppen randomisiert und per Stanze in der Ohrmuschel gekennzeichnet. Für jedes Tier wurde ein Protokoll erstellt, in welchem der Code für das entsprechende Tier, das Aufnahmedatum, das Körpergewicht zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen, das OP-Datum, die Lokalisation der Tumoren sowie deren Gewicht detailliert erfasst wurde.

Aufgrund der tierexperimentell-bedingt niedrigen Fallzahl ergab das Datenmaterial keine Normalverteilung. Daher wurden die Daten mit nichtparametrischen Verfahren analysiert. Zunächst wurden die Gruppen mittels Kruskal - Wallis - Test für k unabhängige Stichproben auf Unterschiede geprüft. Zur Evaluierung eines Trends der positiven Korrelation zwischen steigender Taurolidin-Konzentration und Wirkung wurde der Jonckheere-Terpstra - Test verwendet. Der direkte Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-U - Test vorgenommen. Das Signifikanzniveau wurde mit $p=0.05$ festgelegt. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 11.0 für Windows (SPSS Inc. Chicago, Ill.) durchgeführt. Die Daten im Text wurden als Median und in Klammern das untere und obere Quartil angegeben. Die Grafiken wurden mittels Box-Whisker-Plots dargestellt.

Die Recherche zu den Studien erfolgte via PubMed. Als Suchbegriffe wurden „taurolidine OR taurolidin OR taurolin AND cancer“ verwandt.

4 Ergebnisse

Die der statistischen Auswertung zugrundeliegende Anzahl der Tiere pro Gruppe (n) ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Verteilung der Tierzahlen pro Gruppe (TRD = Taurolidin).

	Kontrolle	TRD 1%	TRD 2%	TRD 3%
intermittierende Therapie (A)	n=10	n=10	n=10	n=10
Bolustherapie (B)	n=10	n=9	n=10	n=10

Ein Tier ist nach Beschädigung des Nahtmaterials im Rahmen der postoperativ intensivierten Fellpflege an einer Peritonitis erkrankt und vor dem Erreichen des Studien-Endzeitpunktes an einer Sepsis verstorben.

Alle erfassten Tumorknoten waren in der Bauchhöhle oder subkutan am Rücken lokalisiert. Es gab keine makroskopischen Hinweise auf Lungenmetastasen und Lebermetastasen. Zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie - eine Woche vor Operation - wogen die Tiere im Median 242 g (227 - 271).

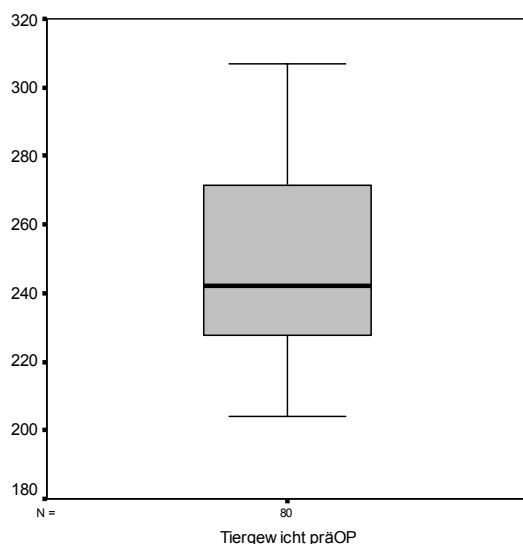


Abb. 3: Körpergewicht (in g) der Tiere eine Woche vor operativer Intervention

4.1 Das subkutane Tumorstwachstum

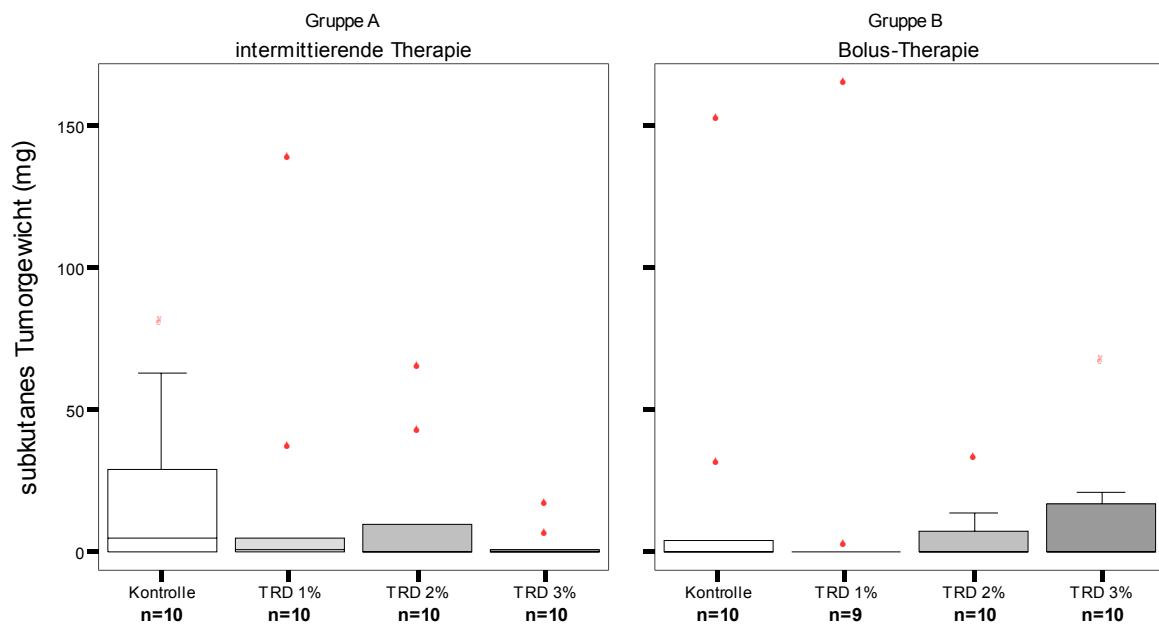


Abb. 4: **Subkutanes Tumorgewicht** nach intermittierender - vs. Bolustherapie mit Taurolidin (TRD) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$ - Mann-Whitney-U Test). Die Ergebnisse der Kontrollgruppe A und Kontrollgruppe B unterscheiden sich nicht ($p = 0,353$, Mann-Whitney-U Test).

In der Gruppe A (Intermittierende Therapie) ist der Jonckheere-Terpstra - Test (Trendtest zur Evaluation einer Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Taurolidin) sowohl für das *subkutane Tumorgewicht*, als auch für die *Anzahl der subkutanen Metastasen* signifikant. Für das Tumorgewicht beträgt der p-Wert 0,048 und für die Anzahl der Tumorknoten $p = 0,009$.

Das subkutane Tumorgewicht (Abb. 4) konnte im Direktvergleich mittels Mann-Whitney-U – Test durch 1% (1 mg (0 - 12,75) $p = 0,529$), 2% (0 mg (0 - 18) $p = 0,315$) und 3% (0 mg (0 - 2,25) $p = 0,075$) Taurolidin gegenüber der Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung (5 mg (0,75 - 37,5)) in der Gruppe A (Intermittierende Therapie) nicht reduziert werden (siehe auch Tab. 2).

Die Anzahl subkutaner Metastasen (Abb. 5) ist unter 3% Taurolidin-Therapie (0 (0 - 1) $p = 0,035$) gegenüber der Kontrollgruppe (1,5 (0 - 3)) reduziert.

Die Daten aller Gruppen sind mittels Mann-Whitney-U - Test (für zwei unabhängige Stichproben) auf signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe geprüft worden und in den Tabellen 2 und 3 gegenübergestellt.

Tab. 2: Vergleich des **subkutanen Tumorgewichtes** der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U - Test: angegeben ist der Median, in Klammern unteres und oberes Quartil und die exakte Signifikanz (p). *Jonckheere-Terpstra - Test: In der Gruppe mit intermittierender Applikation besteht ein signifikanter Trend zu verstärkter Tumormassenreduktion unter steigenden Taurolidin-Dosierungen.

Gruppe A intermitt. Therapie	Taurolidin 1% 1 mg (0 – 12,75)	Taurolidin 2% 0 mg (0 - 18)	Taurolidin 3% 0 mg (0 - 2,25)
Kontrolle 5 mg (0 - 37,5)	p=0,529	p=0,315	p=0,075
J-T - Test*	p=0,048*		

Gruppe B Bolustherapie	Taurolidin 1% 0 mg (0 - 1)	Taurolidin 2% 0 mg (0 – 8,75)	Taurolidin 3% 0 mg (0 - 18)
Kontrolle 0 mg (0 - 10,75)	p=0,549	p=0,796	p=0,971
J-T - Test	p=0,917		

Tab. 3: Vergleich der **Anzahl subkutaner Metastasen** der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U - Test: angegeben ist der Median, in Klammern unteres und oberes Quartil und die exakte Signifikanz (p). *Jonckheere-Terpstra - Test: In der Gruppe mit intermittierender Applikation besteht ein signifikanter Trend zur Verminderung der Anzahl von Tumorknoten bei steigenden Konzentrationen. **Taurolidin 3% reduziert die Anzahl der subkutanen Tumorknoten gegenüber der Kontrollgruppe.

Gruppe A intermitt. Therapie	Taurolidin 1% 1 (0 - 3)	Taurolidin 2% 0 (0 - 1,25)	Taurolidin 3% 0 (0 - 1)
Kontrolle 1,5 (0 - 3)	p=0,481	p=0,105	p=0,035**
J-T - Test*	p=0,009*		

Gruppe B Bolustherapie	Taurolidin 1% 0 (0 -1)	Taurolidin 2% 0 (0 - 1)	Taurolidin 3% 0 (0 - 1)
Kontrolle 0 (0 - 1,25)	p=0,720	p=0,684	p=0,971
J-T - Test	p=0,988		

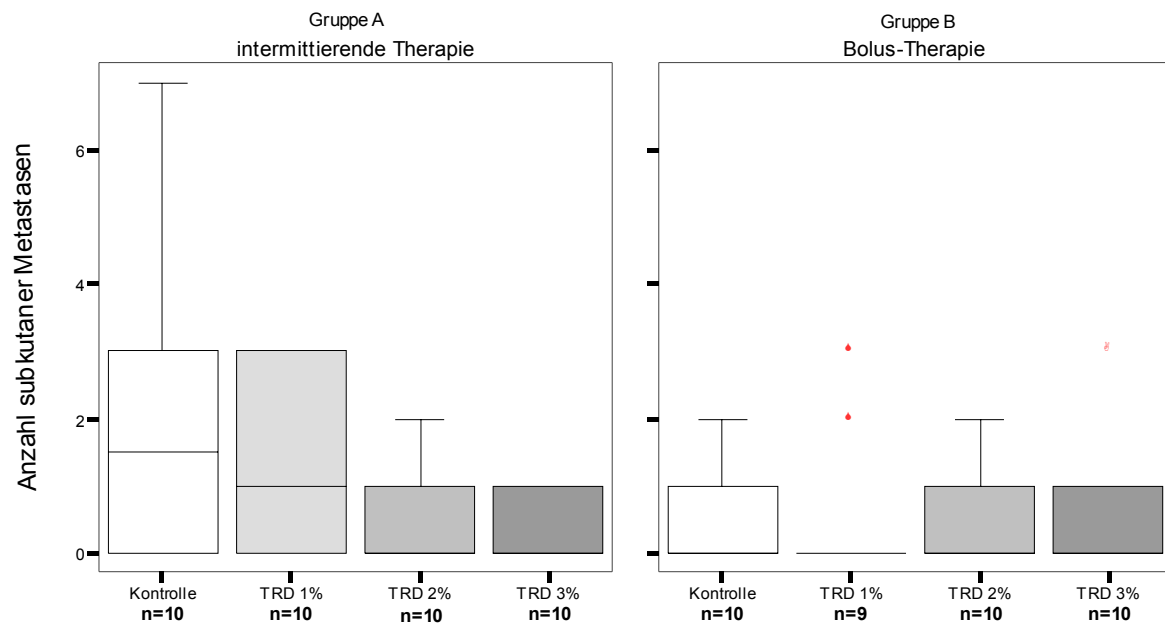


Abb. 5: Anzahl subkutaner Metastasen nach intermittierender - vs. Bolustherapie mit Taurolidin (TRD). Nach 3% TRD Applikation in Gruppe A - Reduktion der Anzahl der Metastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,035$). Die Ergebnisse der Kontrollgruppe A und Kontrollgruppe B unterscheiden sich nicht ($p=0,105$, Mann-Whitney-U Test).

4.2 Das intraperitoneale Tumorwachstum

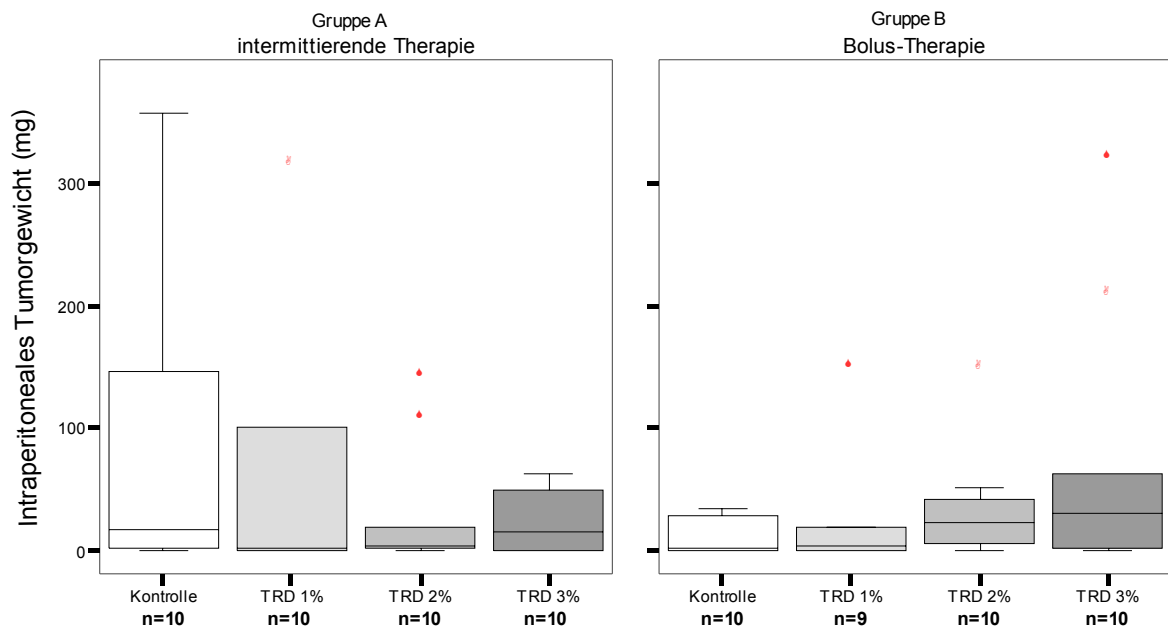


Abb. 6: **Intraperitoneales Tumorgewicht** nach intermittierender - vs. Bolustherapie mit Taurolidin (TRD) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Tumorgewicht in der Kontrollgruppe unterscheidet sich nicht vom Tumorgewicht in den Therapiegruppen ($p>0,05$). Die Ergebnisse der Kontrollgruppe A und Kontrollgruppe B unterscheiden sich nicht ($p=0,280$, Mann-Whitney-U Test).

Das intraperitoneale Tumorstadium unter Taurolidin - Therapie (Abb. 6) unterschied sich nicht zur Kontrollgruppe. Sowohl unter dem Bolus-Therapie-Regime (Gruppe B), als auch unter intermittierender Infusionstherapie (Gruppe A) lag die exakte Signifikanz mittels Mann-Whitney-U - Test für zwei unabhängige Stichproben bei $p > 0,05$. Die Gegenüberstellung der Daten der einzelnen Gruppen ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Vergleich des **intraperitonealen Tumorgewichtes** der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U - Test: angegeben ist der Median, in Klammern unteres und oberes Quartil und die exakte Signifikanz (p). *Jonckheere-Terpstra - Test - Trendevaluation der Tumormassenreduktion über die Gruppen Taurolidin 1%, 2% bis 3%

Gruppe A intermitt. Therapie	Taurolidin 1% 0,5 mg (0 - 154,75)	Taurolidin 2% 3,5 mg (0,75 - 40,5)	Taurolidin 3% 15,5 mg (0 - 51,75)
Kontrolle 16 mg (1,5 - 178,75)	p=0,280	p=0,218	p=0,529
J-T - Test*	p=0,615		

Gruppe B Bolustherapie	Taurolidin 1% 4 mg (0 - 18,5)	Taurolidin 2% 21,5 mg (4,5 - 44,25)	Taurolidin 3% 30 mg (0,75 - 99,5)
Kontrolle 1,5 mg (0 - 29,5)	p=0,905	p=0,190	p=0,190
J-T - Test*	p=0,074		

Der Jonckheere-Terpstra - Test ergab keinen Trend der ip Tumorgewichtsreduktion unter steigender Taurolidin - Konzentration (Gruppe A: $p=0,615$; Gruppe B: $p=0,375$).

Die Anzahl intraperitonealer Metastasen (Abb. 7) pro Tier unterschied sich zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe nicht ($p > 0,05$). Siehe hierzu auch die Gegenüberstellung der Gruppen in Tabelle 4.

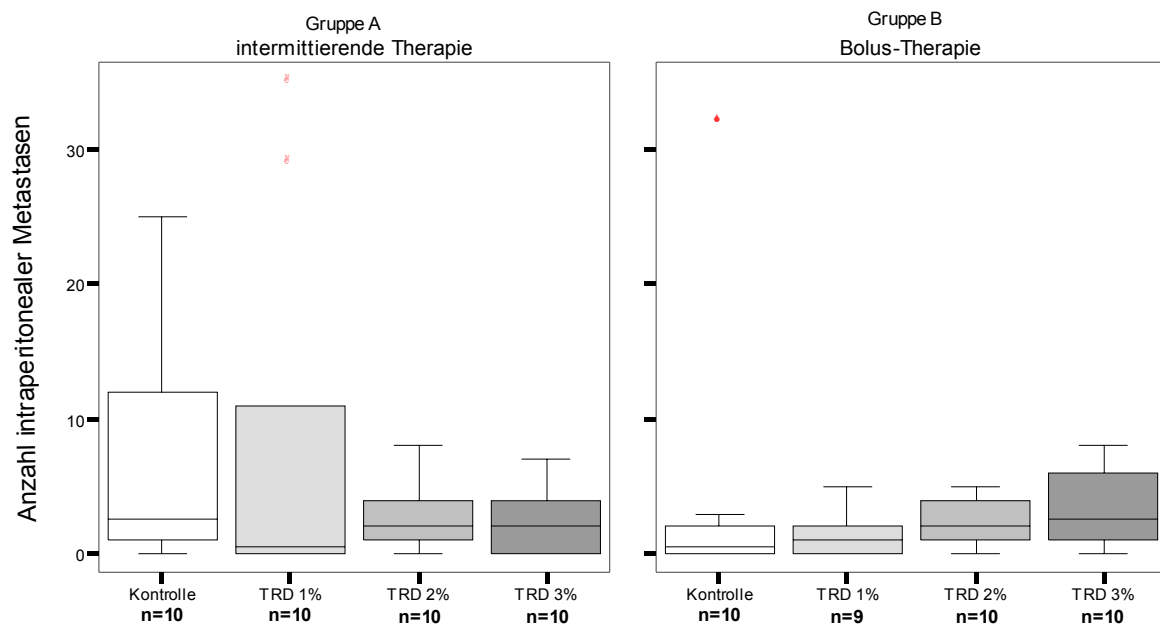


Abb. 7: **Anzahl peritonealer Tumorknoten** nach intermittierender - vs. Bolustherapie mit Taurolidin (TRD) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$). Die Ergebnisse der Kontrollgruppe A und Kontrollgruppe B unterscheiden sich nicht ($p = 0,123$, Mann-Whitney-U Test).

Tab. 5: Vergleich der **Anzahl intraperitonealer Metastasen** der Kontrollgruppe mit den Therapiegruppen mittels Mann-Whitney-U - Test: angegeben ist der Median, in Klammern unteres und oberes Quartil und die exakte Signifikanz (p). *Jonckheere-Terpstra - Test; Trendevaluation über die Gruppen Taurolidin 1%, 2% bis 3%

Gruppe A intermitt. Therapie	Taurolidin 1%	Taurolidin 2%	Taurolidin 3%
Kontrolle 2,5 (0,75 - 12,75)	0,5 (0 - 15,5)	2 (0,75 - 4,25)	2 (0 - 4,25)
	$p=0,353$	$p=0,436$	$p=0,393$
J-T - Test*	$p=0,563$		

Gruppe B Bolustherapie	Taurolidin 1%	Taurolidin 2%	Taurolidin 3%
Kontrolle 0,5 (0 - 2,25)	1 (0 - 3)	3 (0,5 - 4,5)	2,5 (0,75 - 6)
	$p=0,780$	$p=0,218$	$p=0,143$
J-T - Test*	$p=0,051$		

4.3 Das periphere Blutbild

Zur Verifizierung eines Einflusses von Taurolidin auf die Knochenmarksfunktion wurden den Tieren an fünf Zeitpunkten Blutproben entnommen. Die ermittelten

Zellzahlen wurden auf Differenzen zwischen den Therapiegruppen (Taurolidin 1%, 2%, 3% vs. Kontrollgruppe und die drei Taurolidingruppen gegeneinander), zwischen den Applikationsformen (Intermittierende vs. Bolustherapie) und zwischen den einzelnen Abnahmezeitpunkten (siehe Kapitel 3.5) mittels Mann-Whitney-U - Test untersucht. Um Fehler durch differierende Ausgangswerte zu vermeiden, wurden die *relativen Änderungen* der Zellzahlen über die Zeit berechnet. Hierzu wurde die prozentuale Änderung des Wertes von Blutentnahme eins (BE1) zu BE2 bezogen auf den Ausgangswert (BE1) des Tieres ermittelt. Diese relativen Änderungen der Zellzahlen wurden für jedes Tier und alle Blutentnahmen berechnet. Anschließend wurden diese Werte zwischen den Gruppen mittels Mann-Whitney-U - Test verglichen. Dabei fanden sich weder in den Leukozyten, noch in ihren Subpopulationen signifikante Abweichungen im Sinne einer Suppression durch das Chemotherapeutikum.

4.3.1 Die Leukozyten

Im perioperativen Zeitraum konnte in der Kontrollgruppe eine Reduktion der Leukozytenzahlen registriert werden ($p < 0,01$). Postoperativ wurde diese Leukopenie rekompensiert (siehe Abb. 8). Dieser Verlauf ist in allen Therapiegruppen gleichermaßen ausgeprägt ($p < 0,05$). Dabei besteht kein Unterschied in der Ausprägung der Leukopenie und der Rekompensation zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe ($p > 0,05$).

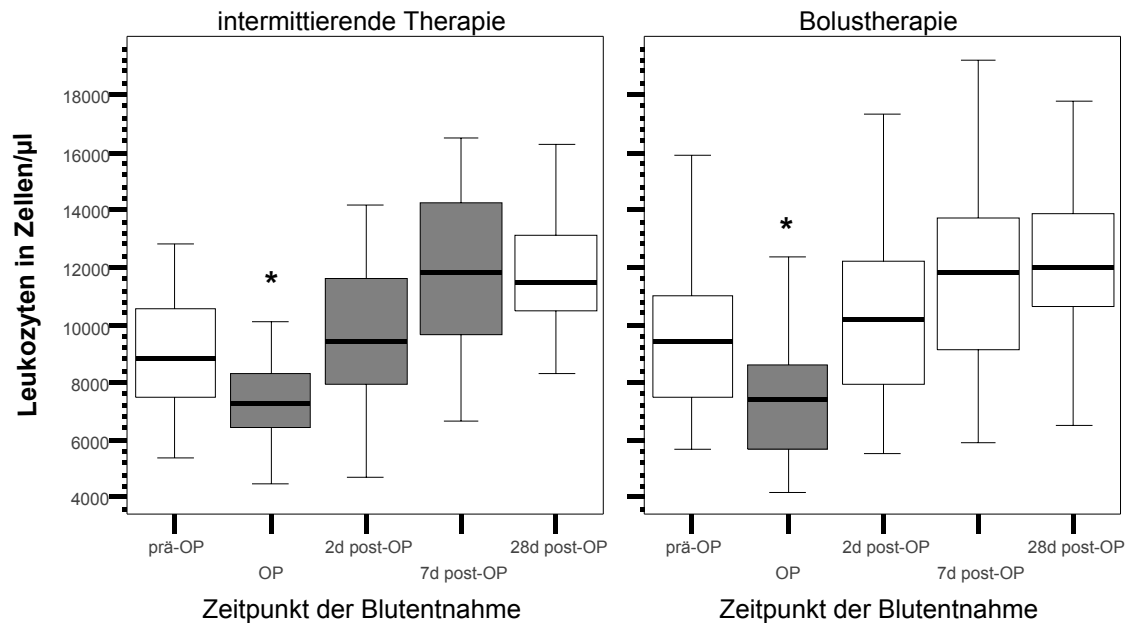


Abb. 8: Perioperative Leukozytenzahlen - signifikanter Abfall 2h postoperativ in allen Gruppen ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U - Test). Die postoperative Rekompensation erfolgte in allen Gruppen. Blutproben, die zu Zeitpunkten von Therapiezyklen entnommen wurden, sind dunkelgrau hervorgehoben.

Bei der Gegenüberstellung der Absolutzahlen im Verlauf ergab sich keine Taurolidin-assoziierte Veränderung der Leukozytenzahlen innerhalb der einzelnen Gruppen. Vielmehr wurde die, in allen Gruppen zu verzeichnende postoperative Zelldepression, sowohl in den Bolusgruppen, als auch unter einwöchiger Therapie (Gruppe A) vollständig rekompensiert. Am zweiten postoperativen Tag haben sich alle Leukozytenwerte wieder normalisiert.

Um kleine Unterschiede zwischen den Gruppen herauszuarbeiten, wurde in allen Gruppen zu jedem Zeitpunkt die relative Leukozytenzahländerung zu den Ausgangswerten berechnet und mit der Kontrollgruppe verglichen. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede ($p > 0,05$).

4.3.2 Die Lymphozyten

Die peripheren Lymphozytenzahlen wiesen eine Reduktion zwei Tage nach der OP auf. (siehe Abb. 9) (Kontrolle (A0) präOP=7660/µl (5774-10304); 2h postOP=5236/µl (4245-6171); $p = 0,011$). Dieser Verlauf ist in allen Gruppen zu beobachten. Um einen Unterschied in der Graduierung der Lymphopenie zwischen den Gruppen verifizieren zu können, war es notwendig, die relative Differenz der Lymphozytenzahl jedes Tieres zwischen zwei Blutentnahmen zu bestimmen und anschließend die einzelnen

Gruppen mittels Mann-Whitney-U - Test auf Unterschiedlichkeit zu untersuchen. Hierbei sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet worden ($p > 0,05$).

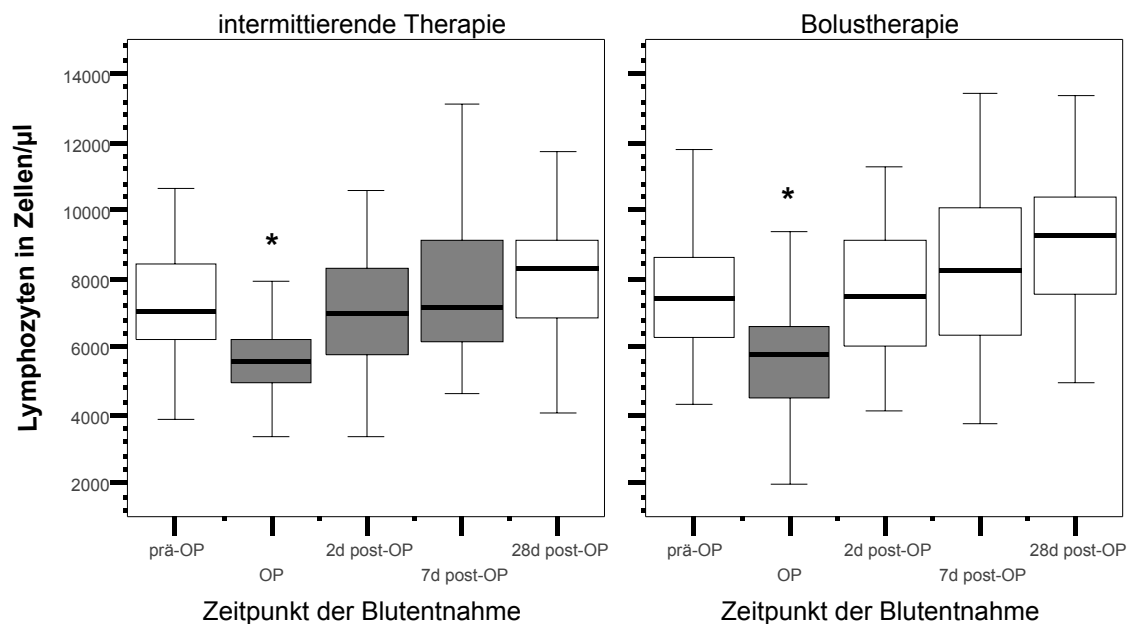


Abb. 9: Perioperative Lymphozytenzahlen - die Therapiegruppen sind zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst. *signifikanter Abfall 2h postoperativ ($p < 0,05$ Mann-Whitney-U - Test). Die Rekompensation erfolgte in allen Gruppen. Blutproben, die zu Zeitpunkten von Therapiezyklen entnommen wurden, sind dunkelgrau hervorgehoben.

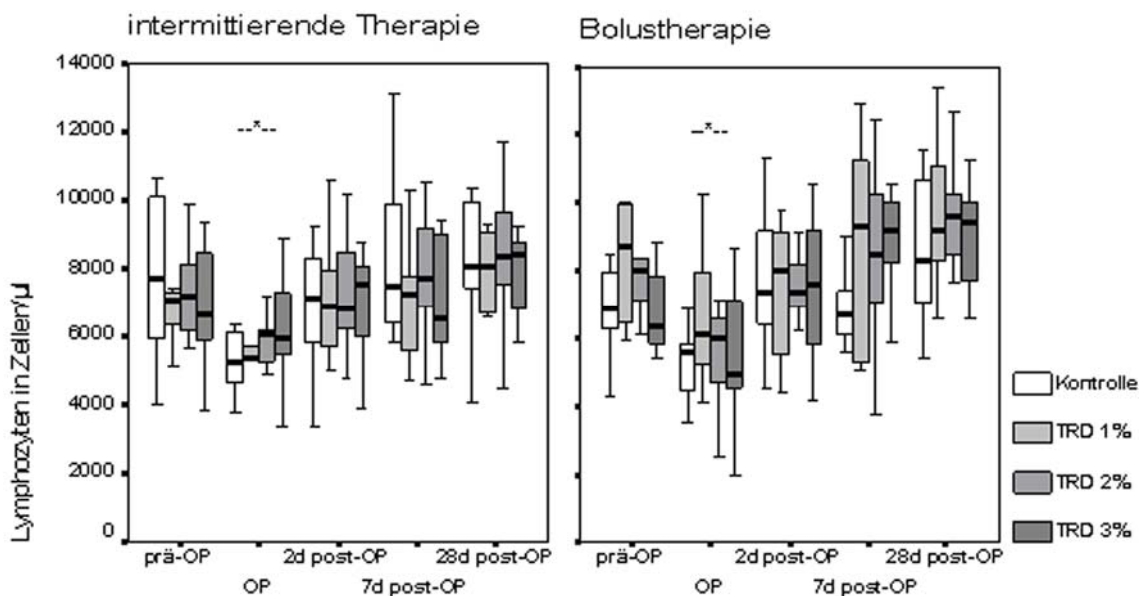


Abb. 10: Lymphozytenzahlen: Die in Abbildung 9 in einem Boxplot zusammengefassten 4 Therapiegruppen sind hier einzeln abgebildet. Unterschiede zwischen den Therapiegruppen sind zu allen Untersuchungszeitpunkten $p > 0,05$ (Kruskal-Wallis - Test)

4.3.3 Die Monozyten

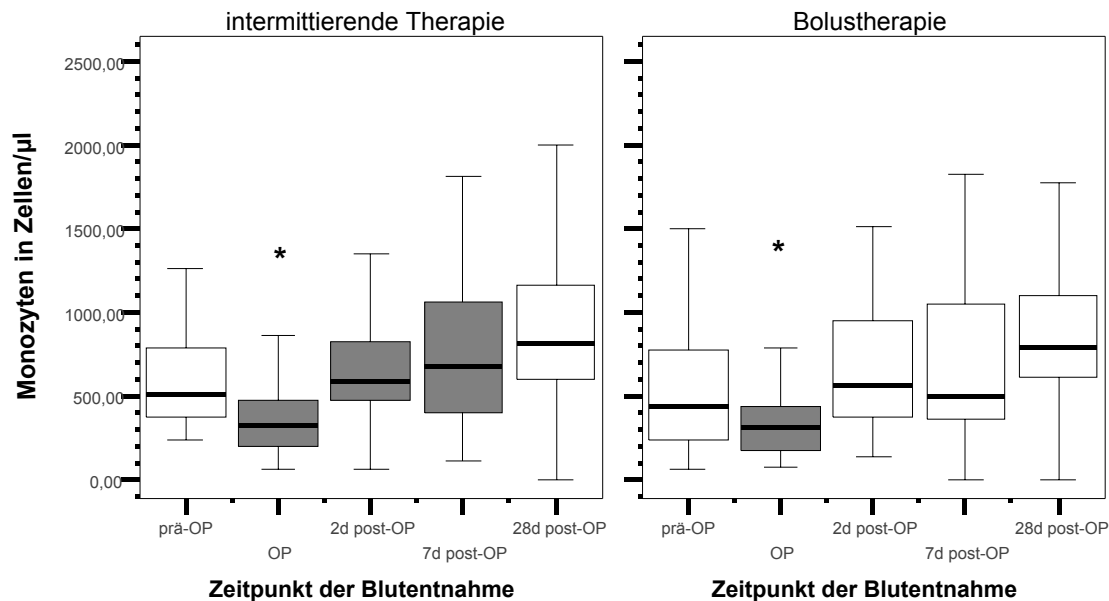


Abb. 11: Perioperative Monozytenzahlen - die Therapiegruppen sind zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst. *signifikanter Abfall 2h postoperativ (Gruppe A - $p=0,0001$; Gruppe B - $p=0,034$, Mann-Whitney-U - Test). Blutproben, die zu Zeitpunkten von Therapiezyklen entnommen wurden, sind dunkelgrau hervorgehoben.

In der Population der Monozyten konnte ebenfalls ein postoperativer Abfall mit anschließender Rekompensation verzeichnet werden ($p=0,0001$ in Gruppe A und $p=0,034$ in Gruppe B) (siehe Abb. 11). Im Vergleich der Therapiegruppen mit der Kontrollgruppe konnte kein Unterschied festgestellt werden ($p>0,05$), so dass als Ursache für die gleichförmige Alternation ein allen Gruppen gleichsamer Reiz, wie z.B. ein Postaggressionssyndrom im Rahmen des operativen Traumas in Betracht kommt. Als weitere Faktoren auf die Werte könnten die Narkose und die postoperative Wundheilung Einfluss nehmen. Die Ergebnisse zeigen keine Depression der Monozytenzahlen als kurz- oder langfristigen Effekt einer Taurolidin-Therapie.

4.3.4 Die Granulozyten

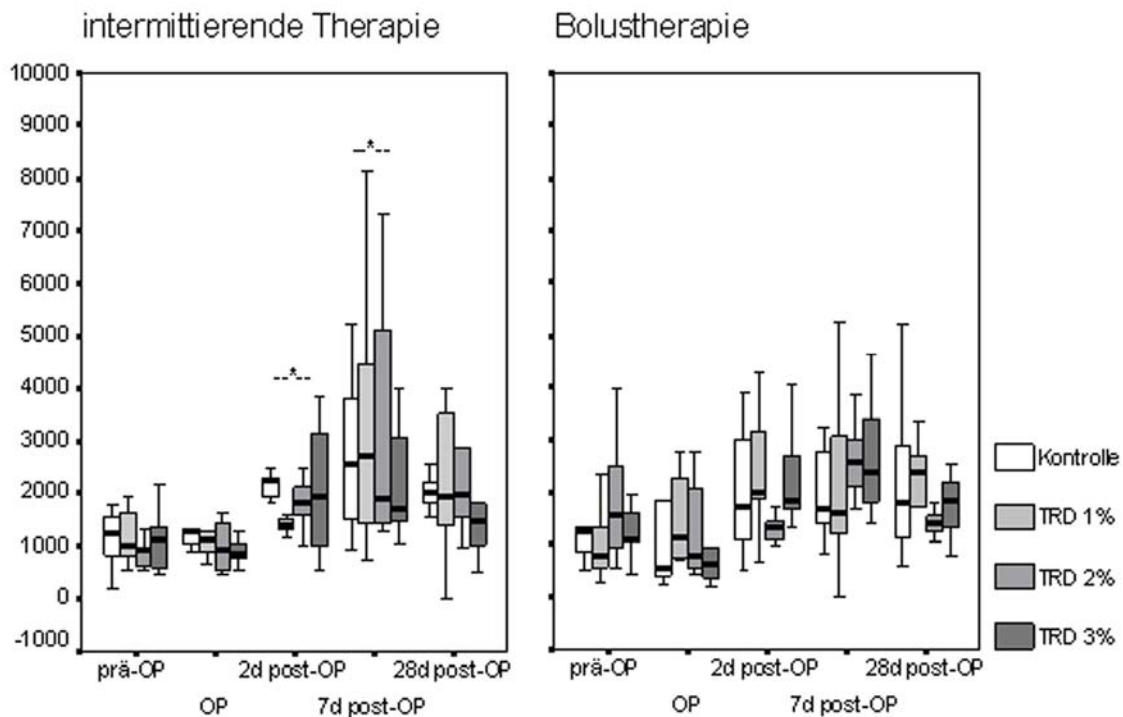


Abb. 12: Granulozyten im peripheren Blutbild (Zellen pro μl). Postoperativ ist ein Anstieg der Granulozytenzahlen zu beobachten ($p < 0,05$). Die Veränderungen sind als reaktiv zu werten (Postaggressionssyndrom, Narkose), weil sie zwischen den Gruppen nicht verschieden sind ($p > 0,05$).

Die Anzahl der Granulozyten im peripheren Differenzialblutbild unterschied sich zwischen den Gruppen zu keinem Untersuchungszeitpunkt ($p = 0,111-0,543$; Kruskal-Wallis - Test). Zwei Tage postoperativ konnte ein Anstieg der Granulozyten verzeichnet werden (Kontrolle (A) prä-OP=1240 (798-1612); 2d post-OP=2242 (1858-2346); $p = 0,02$). Gleichartige Veränderungen traten auch in allen anderen Gruppen auf. Der Grad des Anstieges der Granulozyten ist zwischen den Gruppen nicht verschieden ($p > 0,05$). Im direkten Vergleich der relativen Änderung der Granulozytenzahlen der einzelnen Gruppen bezogen auf die Kontrollgruppe, ergibt sich eine gleichartige Reaktion aller Gruppen auf die Intervention und Therapie. So konnte ein Unterschied in der Quantität des postoperativen Granulozytenanstieges ausgeschlossen werden.

4.3.5 Die eosinophilen Granulozyten und Erythroblasten

Eosinophile Granulozyten und Erythroblasten traten nur vereinzelt im peripheren Blutbild auf. Es konnte keine Häufung in einer Gruppe gezeigt werden.

4.3.6 Das Differentialblutbild im Überblick

Bei der Betrachtung der relativen Verteilung der weißen Zellreihe wird deutlich, dass die beobachtete Suppression der einzelnen Subklassen auf die postoperative Reduktion der Gesamt-Leukozytenzahl zurückzuführen ist. Die prozentuale Verteilung der Subpopulationen zwischen der präoperativen und der 2h post-OP - Messung unterscheidet sich nicht signifikant ($p>0,05$) (siehe Abb. 13). Der beschriebene Effekt ist am ehesten als Folge des operativen Eingriffes und der Infusion (Verdünnungseffekt) zu werten. Taurolidin beeinflusst diesen Effekt nicht signifikant ($p>0,05$).

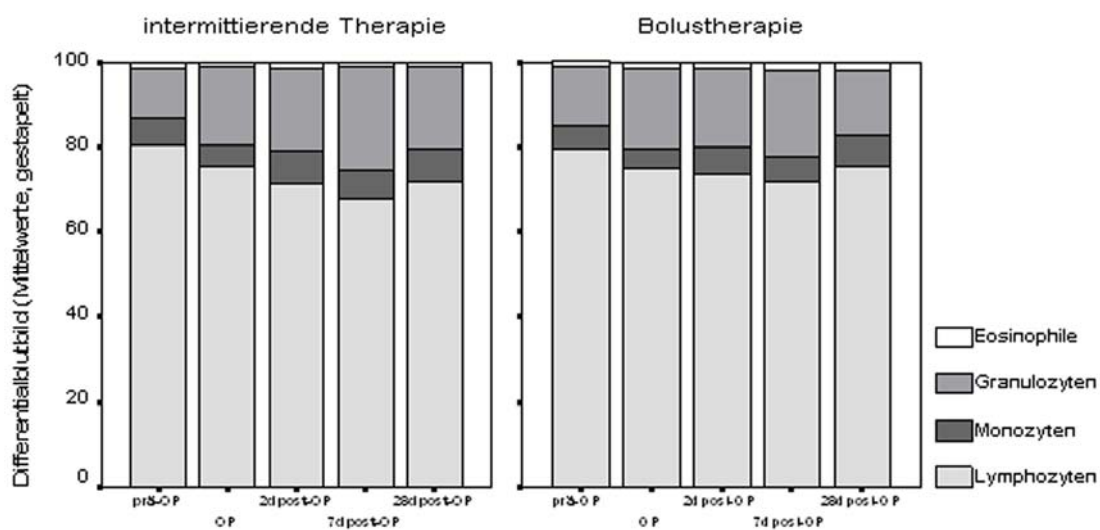


Abb. 13: Differentialblutbild im perioperativen Zeitraum (Mittelwerte). Es besteht kein Unterschied in der prozentualen Verteilung zwischen prä-OP und OP ($p>0,05$).

4.4 Das Körpergewicht der Tiere

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes war anhand des Körpergewichtes kein Hinweis auf eine Taurolidin-assoziierte Wachstumsverzögerung zu beobachten. (Abb. 14)

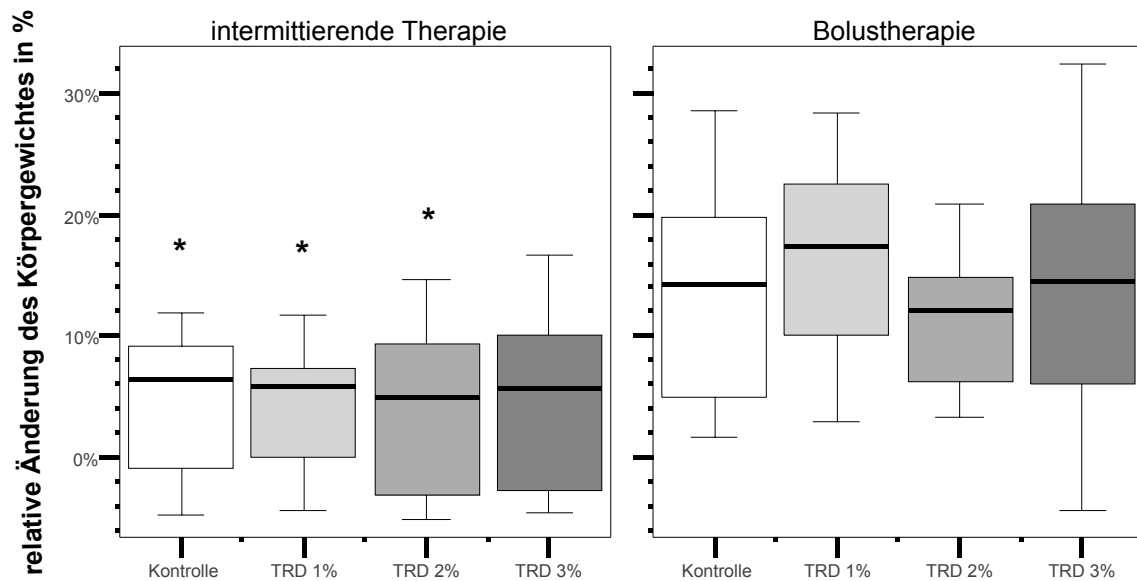


Abb. 14: Die Körpergewichtszunahme der Tiere zwischen präoperativem Zeitpunkt und 7d postoperativ (Zeitpunkt des Endes der Infusionstherapie). Verglichen wurden gleiche Gruppen der intermittierenden Therapie mit der Bolustherapiegruppe mittels Mann-Whitney-U - Test. In der Gruppe A konnte eine Wachstumsretardierung in der Kontrollgruppe ($p=0,015$), TRD 1% ($p=0,004$) und TRD 2% ($p=0,035$) gegenüber dem Bolus-Therapieregime (B) nachgewiesen werden. Der Unterschied bei TRD 3% ist mit $p=0,075$ nicht signifikant.

Zur Auswertung des Einflusses von Taurolidin auf das Wachstum der Tiere wurde aus den Messdaten die relative Gewichtszunahme über den Infusionszeitraum berechnet, um Fehler durch differierende Initialgewichte zu minimieren. Der direkte Vergleich der einzelnen Therapiegruppen untereinander (1%, 2%, 3% gegen die Kontrollgruppe) mittels Mann-Whitney-U - Test ergab keine Unterschiede ($p>0,05$). Der Vergleich beider Applikationsformen (intermittierende Therapie vs. Bolustherapie) ergab eine passagäre Wachstumsverzögerung in nahezu allen Infusionsgruppen gegenüber den Bolus - Therapie - Gruppen (Gruppe A vs. Gruppe B: Kontrolle $p=0,015$; 1% $p=0,004$; 2% $p=0,035$) (siehe Abb. 14).

Der Abbildung kann weiterhin entnommen werden, dass einige Tiere der Infusionsgruppe (A) innerhalb der Therapiewoche an Körpergewicht verloren haben. In den Bolusgruppen (B) tritt kein Gewichtsverlust auf. Somit ist hier eher nicht das operative Trauma eines intraabdominellen Eingriffes, sondern vielmehr der Stress der rezidivierenden Kurznarkosen im Rahmen der 6-stündlichen Infusionen und zweimaligen Blutentnahmen die Ursache für den Wachstumsangel.

Die Untersuchung der Gewichtszunahme im weiteren Verlauf bis zum Zeitpunkt der

Obduktion zeigte eine vollständige Rehabilitation und eine Angleichung an das Wachstumsverhalten der Bolus - Gruppe. ($p>0,05$) (siehe Abb. 15)

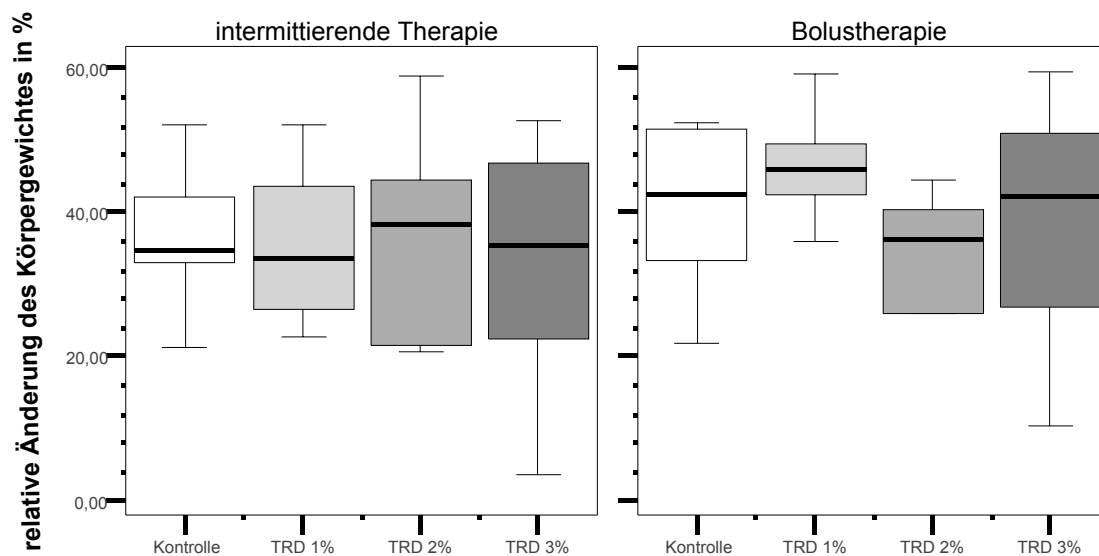


Abb. 15: Die Körpergewichtszunahme der Tiere zwischen präoperativem Zeitpunkt und 28d postoperativ (Zeitpunkt der Obduktion). Die initialen Unterschiede im Wachstum (relative Gewichtszunahme) zwischen Gruppe A und Gruppe B sind zum Zeitpunkt der Obduktion nicht mehr nachweisbar. ($p>0,05$)

5 Diskussion

Die Suche nach potenten und nebenwirkungsarmen Therapeutika für die Behandlung maligner Tumoren steht im Mittelpunkt der onkologischen Forschung. In der Chirurgie besteht insbesondere der Bedarf an einer nebenwirkungsarmen Standardtherapie zur Verminderung lokoregionärer Rezidive und Trokarmetastasen nach tumorchirurgischen Eingriffen. Trokarmetastasen sind ein spezifisches Problem laparoskopischer Onko-Chirurgie, die in den letzten Jahren zunehmend auch für die Resektion kolorektaler Malignome zur Anwendung kam [23,24,26,27]. Ausgehend von der Theorie, dass perioperativ mobilisierte Tumorzellen vor allem an Stellen peritonealer Irritation durch Trokare adhären, wurden antiadhärente Substanzen wie Heparin und Taurolidin auf protektive Wirksamkeit untersucht.

Taurolidin, ein Derivat der Aminosäure Taurin, wurde in seiner ursprünglichen Indikation bei der Peritonitis seit vielen Jahren erfolgreich klinisch eingesetzt. Dabei traten sowohl bei intraperitonealer, als auch bei intravenöser Applikation nur geringe Nebenwirkungen auf [12].

Zahlreiche Daten zeigen heute, dass Taurolidin auch über seine antiadhärenten Eigenschaften hinaus Wirkkomponenten besitzt, die den Einsatz bei der Therapie maligner Erkrankungen begründen könnten [19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,34,38].

5.1 Taurolidin in der intravenösen Anwendung

Neben der Verhinderung von Lokalrezidiven nach onkochirurgischen Eingriffen, steht auch der Einsatz von Taurolidin als adjuvantes Chemotherapeutikum in Entwicklung. Insbesondere für dieses Gebiet ist es erforderlich, eine systemische Applikationsform zu finden. Auch die protrahierte intraperitoneale Gabe mittels Etappenlavage ist problematisch und für den Patienten sehr belastend. Der Einsatz einer programmierten Etappenlavage mit Taurolidin wird nicht zuletzt deshalb zurückhaltend diskutiert, da jeder weitere chirurgische Eingriff im Sinne einer „second hit“ Theorie [15,36] die körpereigene Abwehr schwächt und Tumorzellen bessere Angriffsmöglichkeiten bietet. Alternativ dazu ist eine postoperative Spülung über Drainagen ohne erneute Laparotomie möglich, jedoch aufgrund des starken Schmerzreizes nur in Narkose möglich.

Das Ziel der aktuellen tierexperimentellen Studie war es, zu untersuchen, ob die

positiven Ergebnisse einer *lokalen* Behandlung mit Taurolidin auf eine *systemische* Applikationsform übertragbar sind. Dabei wurde der Einfluss der Konzentration, sowie der Wirkdauer von Taurolidin auf zwei unterschiedliche Kompartimente (subkutan und intraperitoneal) beurteilt. Darüber hinaus diente der Versuch der Erfassung und Dokumentation von unerwünschten Nebenwirkungen einer systemischen Taurolidin-Therapie mit steigenden Konzentrationen.

Als Nullhypothese (H0) wurde angenommen, dass eine prolongierte systemische Taurolidin-Therapie steigender Konzentration keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hat. Als Alternativhypothese (H1) wurde formuliert,

1. dass Taurolidin iv a) das intraperitoneale und b) subkutane Tumorwachstum hemmt,
2. dass Taurolidin iv in hohen Konzentrationen das Tumorwachstum stärker hemmt, als in geringen Konzentrationen,
3. dass eine einwöchige intermittierende Therapie das Tumorwachstum stärker hemmt, als eine einmalige postoperative Bolustherapie.

Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede der Wirksamkeit von Taurolidin in den verschiedenen Kompartimenten - intraperitoneal und subkutan. Die erste Alternativhypothese konnte nicht mit statistischer Signifikanz belegt werden. Während hohe Konzentrationen von Taurolidin die Anzahl subkutaner Metastasen reduzieren können ($p=0,035$), konnte das subkutane Tumorgewicht auch durch eine hochdosierte intermittierende Infusionstherapie mit 3% Taurolidin gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,075$) nicht supprimiert werden (zu 1b: Nullhypothese). Dennoch konnte eine Trenduntersuchung eine Abhängigkeit zwischen Taurolidin-Konzentration und Wirkung im Sinne eines geringeren Tumorwachstums unter steigenden Konzentrationen des Therapeutikums feststellen (zu 2.: Alternativhypothese). Die Bauchhöhle konnte dagegen auch durch hohe iv - Dosen therapeutisch nicht erreicht werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass intravenös appliziertes Taurolidin peritoneal nicht in dem Maß sezerniert wird, dass wirksame ip Konzentrationen entstehen. Eine systemische Taurolidin-Therapie kann das ip Tumorwachstum nicht beeinflussen (zu 1a: Nullhypothese). Eine Einmal-Applikation (Bolusgruppe) hatte in keiner Therapiegruppe einen tumorstatistischen Effekt (zu 3.: Nullhypothese).

Desweiteren haben die Versuche gezeigt, dass eine Hochdosisbehandlung mit 3% nicht unproblematisch ist: Bei schneller Applikation von 1 ml in unter 15sek fielen regelmäßig vagotone Effekte im Sinne einer reversiblen Atemdepression auf. Die Ursache ist wahrscheinlich auf die hypotone Lösung oder die Volumenbelastung zurückzuführen [12]. Darüber hinaus waren keine toxischen Effekte der Therapie zu beobachten. In keiner Therapiegruppe waren Wachstumsretardierungen oder eine Hemmung der Granulopoese zu verzeichnen. In der Gruppe A (intermittierende Therapie) war postoperativ eine passagäre Wachstumsretardierung zu verzeichnen. Diese war in allen Gruppen gleichermaßen zu beobachten und trat auch in der Kontrollgruppe auf, so dass mit großer Wahrscheinlichkeit der durch die rezidivierenden Kurznarkosen entstehende Stress für das Minderwachstum verantwortlich ist.

Bisherige Ergebnisse von Versuchen mit systemischer Taurolidin - Therapie blieben eher hinter den guten Ergebnissen der topischen Wirkung zurück. Braumann et al. untersuchten in zwei Studien [26,40] an einem Kolonkarzinom-Modell der Ratte (BD-IX - Ratten mit syngenetischen Kolon-Karzinomen) den Unterschied zwischen lokaler (ip) Therapie und einer systemischen (iv) Therapie: Im Zuge eines bauchchirurgischen Eingriffes wurden den Tieren 10.000 Tumorzellen (DHD/K12/TRb) intraperitoneal und subkutan am Rücken appliziert. Anschließend wurden die Tiere in vier Gruppen randomisiert. Gruppe eins wurde mit 0,5% Taurolidin ip therapiert, Gruppe zwei analog dazu iv, Gruppe drei - ip und iv, die vierte Gruppe diente der Kontrolle. Vier Wochen postoperativ wurde das Tumorgewicht ausgewertet.

In Übereinstimmung mit ähnlichen Studien [23,24,25,27,29] konnte das lokale Wachstum durch die lokale Therapie gehemmt werden. Das intraperitoneale Tumorgewicht unterschied sich hingegen nach einer iv Bolusgabe von 1 ml 0,5% Taurolidin nicht von der Kontrollgruppe. Darüber hinaus konnte auch ein parallel angelegter subkutaner Tumor am Rücken der Tiere nicht im Wachstum inhibiert werden. Hier wirkte auch die intraperitoneale Applikationsform nicht tumorsuppressiv. Da Taurolidin zügig über das Peritoneum resorbiert wird, sind für extraperitoneale Verhältnisse zunächst keine Wirkunterschiede zu der iv Applikation zu erwarten. Eine kombinierte ip/iv Therapie ergab keinen Benefit gegenüber der alleinigen ip Applikation.

Weberschock et al. konnten im Gegensatz zu dieser Arbeit eine Wirksamkeit von 2% iv an einem Modell der Lebermetastasierung eines kolorektalen Karzinoms konstatieren [42]. In einer tierexperimentellen Studie an 45 WAG/Rij Ratten wurde Taurolidin systemisch in verschiedenen Konzentrationen (0,5% und 2%) eingesetzt. Die Tiere wurden präoperativ in folgende drei Therapiegruppen randomisiert: Gruppe eins erhielt 0,5 ml 0,5% Taurolidin-Lösung; Gruppe zwei erhielt 0,5 ml 2% Taurolidin-Lösung und eine dritte Gruppe bekam als Negativkontrolle 0,5 ml Ringerlösung. Die Therapie wurde 10 Minuten präoperativ über eine periphere Vene verabreicht. Die operative Intervention bestand in einer medianen Laparotomie. Die Tumorzellen (CC531) wurden daraufhin *intraliesal* appliziert. Vier Wochen postoperativ erfolgte die Obduktion der Tiere und Auswertung des intrahepatischen und intraabdominellen Tumorwachstums, sowie die Bestimmung des Cancer-Index nach Steller.

Die Ergebnisse konnten in allen Parametern eine Tumorsuppression durch 2% Taurolidin aufzeigen. Bei 0,5% Taurolidin unterschieden sich die Ergebnisse nicht von der Kontrollgruppe.

Unsere aktuelle Studie ist dem Setting von Braumann et al. sehr ähnlich. Es wurde dasselbe Tiermodell, sowie dieselben Tumorzellen verwendet. Wie bei Weberschock et al. wurden verschiedene Konzentrationen von Taurolidin getestet. Jedoch wurde die Dosis pro Tier auf 480 mg/d erhöht², um zu evaluieren, ob sich die positiven Ergebnisse bei hochkonzentrierter Lösung von Weberschock et al. an dem Kolon-Karzinom-Modell bei Braumann et al. nachvollziehen lassen. Als Setting wurde daher das Modell der BD-IX Ratte gewählt. Analog zu Weberschock wurden steigende Konzentrationen bis zur Löslichkeitsgrenze (3%) von Taurolidin iv verabreicht.

Wie auch schon in der Studie von Braumann gezeigt, konnte eine Bolus-Therapie (Gruppe B) das Tumorwachstum nicht beeinflussen. Dagegen konnte unter hohen Taurolidin-Dosierungen einer Langzeittherapie (Gruppe A, 3%) die Reduktion der Anzahl der Metastasen ($p=0,035$) und ein Trend der Reduktion des Tumorgewichtes gezeigt werden ($p=0,048$ Jonckheere-Terpstra - Test).

Aus dem Vergleich der Daten der aktuellen Studie mit den Ergebnissen von

² In der vorliegenden Studie wurde in der Gruppe A (Intermittierende Therapie) mit 3% Taurolidin eine maximale Dosis von 480 mg/kgKG/d erreicht. Hierbei wurden viermal täglich 30 mg (entsprechen 120 mg/kg KG) verabreicht.

Braumann und Weberschock ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Worin liegen die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse zu Weberschock et al. (gute Wirksamkeit schon bei einmaliger Injektion von 2% Taurolidin [42])?
2. Ist eine weitere iv Dosissteigerung aufgrund der aktuellen Literatur sinnvoll und technisch möglich?
3. Welche Mechanismen liegen der Wirkungsweise von Taurolidin zugrunde?
4. Kann eine Therapieoptimierung auf der Grundlage der genauen Kenntnis der Wirkungsmechanismen zu einer iv Wirksamkeitsverbesserung führen?

Zu 1.) Analog zu den schon besprochenen Untersuchungen von Braumann et al. [26,40] und im Gegensatz zu den Arbeiten von Weberschock et al. [42], konnten wir in unserer Arbeit keine tumorsuppressive Wirksamkeit auf Zellen in der Bauchhöhle feststellen. Die unterschiedliche Dosierung (20 mg/kg KG (Braumann) vs. 40 mg/kg KG (Weberschock)) als mögliche Ursache für die Diskrepanz konnten wir experimentell durch den Einsatz von 40-120 mg/kg KG pro Einzeldosis und maximal 480 mg/kg KG/d (Gruppe A 3%) nicht bestätigen. Darüber hinaus muss diskutiert werden, ob intralial applizierte Tumorzellen (Weberschock) aufgrund der guten Perfusion der Milz durch ein intravenöses Chemotherapeutikum vielleicht besser erreicht werden können, als intraperitoneale oder subkutane freie Tumorzellen. Ferner ist ein chemoprophylaktischer Therapieansatz, wie in beiden Tumormodellen verwirklicht, unter Umständen besser durch eine präoperative Gabe (Weberschock) umgesetzt, als durch ein post-trauma-treatment (Braumann). Unter diesen Gesichtspunkten ist die Vergleichbarkeit der beiden Tumormodelle eingeschränkt zu beurteilen. Als Schlussfolgerung aus den Daten scheint eine hochdosierte perioperative Applikation sinnvoll (siehe hierzu auch 5.5).

Die weiteren Fragen (2-4) werden in den nächsten Kapiteln erörtert.

5.2 Taurolidin in der Tumorthapie - ein Überblick über die aktuelle Literatur

Zur Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht derzeit eine widersprüchliche Datenlage. In zahlreichen Studien wurde der Einfluss von Taurolidin auf das Tumorstadium in vitro und in vivo untersucht. Die Vergleichbarkeit ist erschwert, da mit sehr uneinheitlichen Maßangaben publiziert wurde ([Dosis pro KG] oder [Dosis pro Tier]

oder [Konzentration der applizierten Lösung]). Zum Teil fehlen Angaben zum Tiergewicht oder der applizierten Konzentration. In den in vitro Studien erfolgten die Konzentrationsangaben zum Teil in $\mu\text{g/ml}$ oder in μM . Zur besseren Übersicht sind die aktuellen Studien in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst und fehlende Größen - soweit durch die Angaben der Autoren reproduzierbar - ergänzt.

Tab. 6: Übersicht über die aktuellen in vitro Taurolidin-Studien. Gegenübergestellt sind untersuchte Konzentrationsbereiche, Tumorzellen und Ergebnisse

Autor	Jahr	Zellen	Tumor	Bereich getestet	Inkubation	wirksam bei	Wirkung (Ausschnitt)
Han	2002	HL-60	Leukämie	50-200µM	6h	150µM	>90% Apoptose
Stendel	2002	C6, HT22, U373	Glia, Astrozytom	3,5µM-14mM		35µM	IC50 bei 88µM 25% Apoptose
Ribizzi	2002	HL-60	Leukämie	1-10mM	1h	1mM	IC100
Ribizzi	2002	PA-1	Ovar	1-10mM	1h	2,5mM	IC100
Calabresi	2001	PA-1	Ovar	0,1-200µM	72h	11,4µM	IC50 mittlere IC50
		SKOV-3	Ovar	0,1-200µM	72h	31,6µM	IC50 liegt in dieser
		DU-145	Prostata	0,1-200µM	72h	9,8µM	IC50 Studie bei
		U-251	neural	0,1-200µM	72h	20,1µM	IC50 10-35µM
		HT-29	Kolon	0,1-200µM	72h	18,6µM	IC50
		HCT-8	Kolon	0,1-200µM	72h	11,5µM	IC50
		HCT-15	Kolon	0,1-200µM	72h	9,6µM	IC50
		B16-F10	Melanom	0,1-200µM	72h	30,1µM	IC50
		MNT-1	Melanom	0,1-200µM	72h	22,1µM	IC50
		H-157	Lunge	0,1-200µM	72h	32,2µM	IC50
		A-549	Lunge	0,1-200µM	72h	26,8µM	IC50
		H596	Lunge	0,1-200µM	72h	34,2µM	IC50
McCourt	2000	DHD/K12/TRb	Kolon	18-88µM	24h	18µM / 88µM	bei 18 Apoptose bei 88 Nekrose
Jacobi	1997	DHD/K12/TRb, CX-1	Kolon		96h	180µM	Hemmung aller Zelllinien
		HV1A3, TFK-1	Gallenblase		96h	180µM	Hemmung aller Zelllinien
Jacobi	1997	DHD/K12/TRb	Kolon		96h	180µM	Hemmung des Wachstums
Stendel	2003	U373	Astrozytom	3,5µM-14mM	48h	126µM	IC50
					48h	bis 704µM	Apoptose
Shrayer	2003	MNT-1	Melanom	12,5-100µM	72h	25,4µM	IC50
		B16F10	Melanom	12,5-100µM	72h	30,9µM	IC50
Petrovic	2003	SCC 15	Plattenepithel	35µM-1,76mM	24h	350µM	höchste Apoptoserate bei 60%
		SCC 4	Plattenepithel	35µM-1,76mM	24h	1,76mM	höchste Apoptoserate bei 90%

Tab. 7: Übersicht über die aktuellen in vivo Taurolidin-Studien und die untersuchten Konzentrationsbereiche (Th_Applik: Applikationsform ip/iv, Th_Konz.: therapeutischen Konzentrationsbereich, # Th.: Anzahl der Therapiezyklen, n: Anzahl der Tiere pro Gruppe, Angaben mit Fragezeichen basieren auf Schätzungen aufgrund fehlender Angaben in den Veröffentlichungen)

Autor	Jahr	Th_Applik	Th_Konz	Einzelddosis mg/kg (KG Tier)	Dosis mg/Tier	# Th.	max 24h Dosis	Tiere_Art	n	Ergebnis der Taurolidin - Gruppen der Studien
Da Costa	2001	ip	2%	100 mg/kg KG (30???)	ca. 3mg??	6	300mg/kg KG	Maus	30	Überleben + III Anzahl Metastasen -
Braumann	2000	ip	1 ml 0,5%	20 mg/kg KG (250)	5mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	15	i.p. Metastasen - III Port-site Metastasen -
Calabresi	2001	ip	2%	800mg/kg KG (25)	20mg	3	1xBolus	Maus	15-21	Tumormasse, Anzahl - III UAW ab 650mg/kg KG
McCourt	2000	ip	???	100 mg/kg KG (250)	25mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	10	Metastasen -
Volz	2000	ip	2ml 0,5%	3-400mg/kg KG (25-30)??	10mg	1	1xBolus	black mice	13	Überleben + III Tumorfest -
Jacobi	1999	ip	1ml 0,5%	20 mg/kg KG (250)	5mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	10	Tumormasse - III Port-site Metastasen -
Jacobi	1997	ip	1ml 0,5%	20 mg/kg KG (250)	5mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	15	Tumormasse, Anzahl -
Jacobi	1997	ip	1ml 0,5%	20 mg/kg KG (250)	5mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	15	Tumormasse - III Port-site Metastasen -
Opitz	2003	ip	1ml 0,5%	20 mg/kg KG (250)	5mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	15	Adhäsionen +/- III Tumormasse, Anzahl -
Braumann	2003	ip	1 ml 0,5%	20 mg/kg KG (250)	5mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	15	Anzahl Port-site und i.p. Metastasen -
Wenger	2002	ip spülung	5 ml 0,5%	???(Gew. unklar)	max 25mg	1	1xBolus	Hamster	20	reduziert Port-site und Tumorfest
Kilian	2003	ip spülung	5 ml 0,5%	???(Gew. unklar)	max 25mg	1	1xBolus	Hamster	20	Hinweis auf antioxidativen Effekt
Braumann	2000	iv	1 ml 0,5%	20 mg/kg KG (250)	5mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	15	keine UAW keine Wirkung
Braumann	2003	iv	1 ml 0,5%	20 mg/kg KG (250)	5mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	15	keine UAW keine Wirkung
Weberschock	2000	iv	0,5ml 0,5%	10 mg/kg KG (250)	2,5mg	1	1xBolus	Ratte	15	keine Wirkung
Weberschock	2000	iv	0,5ml 2%	40 mg/kg KG (250)	10mg	1	1xBolus	Ratte	15	Tumorzinzidenz - III Anzahl Metastasen
[vorliegende Studie]	2005	iv	1ml 1-3%	max 120 mg/kg KG (250)	30mg	4	480mg/kg KG	Ratte BD IX	10	Trend zur Reduktion der sc Fernmetastasen
[vorliegende Studie]	2005	iv	1ml 1-3%	max 120 mg/kg KG (250)	30mg	1	1xBolus	Ratte BD IX	10	keine UAW keine Wirkung
unter antimikrobiellem Aspekt										
Watson	1995	ip		200mg/kg	ca. 6mg??	1	1xBolus	Maus/Sepsis	??	protektiv, stimuliert Makroph. mehrTNFalpha
Hart	1986	ip	2,8ml 2%	200 mg/kg KG (280)	56,4mg	10	3/d 600mg/kg	Ratte/Peritonitis	30	kein Einfluß auf Letalität
Monson	1993	iv		200 mg/kg iv	ca. 6mg??	1	1xBolus	Maus	0	TRD reduziert Mortalität
Hart	1986	iv	2,8ml 2%	200 mg/kg KG (280)	56,4mg	10	3/d 600mg/kg	Ratte/Peritonitis	30	Letalität +/- III keine Verstärkung von Gentamycin

Die angegebenen Experimente weisen eine große Spannbreite wirksamer Taurolidinkonzentration auf. Die IC₅₀ wurde von drei Autoren für einen Bereich 10-126 µM ermittelt [21,29,35,43]. Untersucht wurden hierbei Konzentrationen von 0,1 µM - 14 mM. Größere Differenzen traten in den Ergebnissen zu Apoptoseinduktion auf. Hier postulierten McCourt et al., dass bei 18 µM maximale Apoptoseeffekte auftraten, die unter steigender Konzentration wieder rückläufig waren [20]. Han et al. fanden dagegen an humanen Leukämiezellen (HL-60) 90% Apoptoseinduktion bei einer Konzentration von 150 µM [19]. Darüber hinaus liegen die Werte bei Stendel und Petrovic noch höher (704 µM [35] / 1,76 mM [44]). Unterschiedliche Studienbedingungen, wie Inkubationszeit, unterschiedliche Zellreihen, differente Apoptosemarker erschweren die Vergleichbarkeit zusätzlich. Siehe hierzu auch Kapitel 5.3.

Alle vorgestellten Studien haben jedoch gemeinsam, dass alle untersuchten Zellreihen in vitro auf Taurolidin sensibel sind, sowie dass der Tumor-therapeutische Konzentrationsbereich von Taurolidin erheblich unter der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für Bakterien und Pilze liegt (laut Angaben des Herstellers 200-1024 mg/dl [12]).

Taurolidin wird laut Herstellerangaben [12] nach intraperitonealer Applikation innerhalb von 15 Minuten rasch resorbiert. Genaue Angaben zum Verteilungsvolumen liegen vom Hersteller nicht vor. Daher ist eine Modellrechnung nötig, um den Konzentrationsbereich der in vitro Versuche zur Erklärung der in vivo Versuche mit intravenöser Applikation (wie im vorliegenden Tierexperiment) heranziehen zu können:

Ausgehend von der Annahme, dass für das wasserlösliche Taurolidin 70% des Körpergewichtes als Verteilungsvolumen zur Verfügung stehen, ergeben sich näherungsweise folgende Konzentrationsverhältnisse nach iv - Applikation bei 250 g - Ratten:

1 ml 0,5% Lösung in 175 ml → 28 µg/ml → 99 µM

1 ml 1% Lösung in 175 ml → 57 µg/ml → 201 µM

1 ml 3% Lösung in 175 ml → 171 µg/ml → 602 µM

Dieses Modell ist im folgenden Grundlage für die Diskussion der Ergebnisse des vorliegenden iv-Versuches mit den in vitro - Experimenten zur Apoptoseinduktion

durch Taurolidin. Hierbei ist der Konzentrationsbereich der aktuellen Studie bereits durch zahlreiche in vitro Experimente belegt (siehe Tabelle 6).

In einem Großteil der Tierexperimente wurde bisher jedoch nur die lokale Wirksamkeit auf ip Tumorzellen nach lokaler *intraperitonealer* Applikation untersucht. Dabei ist anzunehmen, dass Taurolidin vor peritonealer Absorption mit seiner *lokalen Konzentration* auf Tumorzellen wirkt. Hierbei muss als Verteilungsvolumen nur die Bauchhöhle berücksichtigt werden, so dass die wirksame Dosis der applizierten Konzentration entspricht. Eine direkte Übertragung der Wirkungskausalität von in vitro auf in vivo ist nicht immer möglich, wie im folgenden Abschnitt erläutert wird:

5.3 Taurolidin induziert den programmierten Zelltod

McCourt et al. untersuchten im Jahr 2000 Kolonkarzinomzellen (DHD/K12/TRb - analog zur vorliegenden Studie) in vitro und in vivo [20] (siehe auch Tabelle 6 und 7). Die Inkubation der Tumorzellen mit Taurolidin in einer Konzentration von 25 µg/ml (88 µM) resultierte in einem 4fachen Abfall der Proliferationsrate und einer 4fachen Steigerung der Nekroserate. Der Zelltod wurde über die Laktatdehydrogenasefreisetzung quantifiziert. Die Ergebnisse bezüglich der Zellapoptose zeigen, dass geringere Konzentrationen von Taurolidin (5 µg/ml; 18 µM) die Induktion des programmierten Zelltodes fördern. Bei höheren Konzentrationen von 25 µg/ml (88 µM) war der Anteil der Zellen mit Einleitung des programmierten Zelltodes wieder rückläufig. Hier stieg der Anteil der nekrotischen Tumorzellen an. Demnach scheint Taurolidin konzentrationsabhängig zwei verschiedene Wirkungen - Apoptose und Zellnekrose - auszulösen.

McCourt et al. untersuchten diese Ergebnisse darüber hinaus auch in einem Tiermodell (BD-IX - Ratten). Sie applizierten nach medianer Laparotomie Tumorzellen und Taurolidin intraperitoneal. Die Dosis betrug 100 mg/kg KG - ca. 25 mg / Tier. In der Taurolidin-Gruppe konnte das Tumorstadium auf 3 (±1) Knoten gegenüber der Kontrollgruppe von 649 (±101) Knoten gesenkt werden. Die Autoren führen die Ergebnisse auf ihre in vitro Versuche zurück, führen dagegen auch andere mögliche Wirkungsweisen, wie die einer potentiellen Tumorstadiuminhibition durch einen Endotoxin-neutralisierenden Effekt an. (siehe auch Kapitel 5.5)

Da keine Angaben über die Konzentration des in vivo verabreichten Taurolidins vorliegen, ist das Nachvollziehen dieser Kausalität zunächst nicht trivial: Die

Wirksamkeit, wie bei McCourt beschrieben, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Effekt der lokalen Einwirkung von Taurolidin auf die simultan verabreichten Tumorzellen in der Bauchhöhle. Eine systemische Wirkkomponente durch peritoneal resorbiertes Taurolidin scheint unwahrscheinlich, da wir an dem analogen Modell in äquivalenten Dosierungen (40, 80, 120 mg/kg KG) bei intravenöser Applikation keinen Effekt auf die intraperitonealen Tumorzellen beobachten konnten. Demnach ist die lokal verabreichte Konzentration für die Vergleichbarkeit von Zellexperimenten und Tierversuchen erforderlich. Die Dosis von 100 mg/kg KG ist die einzige Angabe im Artikel. Daraus kann entnommen werden, dass ein Konzentrationsbereich von 1,25 ml 2% Lösung bis 5 ml 0,5% Lösung in Frage kommt. Diese Annahme entspricht einem Konzentrationsbereich von 20 mg/ml (70 mM) für die 2% Lösung bis 5 mg/ml (17 mM) für die 0,5% Lösung. Geringere Konzentrationen kommen aufgrund des zu großen Volumens nicht in Frage, um eine Dosis von 100 mg/kg KG zu erreichen.

Während der Konzentrationsbereich der in vitro Versuche im Bereich zwischen 5 µg/ml und 25 µg/ml betrug, wurden die Tiere im zweiten Versuch mit 5-20 mg/ml - einer anderen Konzentrations-Größenordnungen untersucht. Diese Vorgehensweise wurde vom Autor nicht begründet. Eine kausale Erklärung der offensichtlichen antineoplastischen Eigenschaften im Tierexperiment mit den in vitro beobachteten Apoptosevorgängen ist daher nur begrenzt möglich, zumal vom Autor beschrieben wurde, dass der Apoptoseeffekt bei höheren Konzentrationen rückläufig ist.

Neben der Arbeitsgruppe um McCourt beschäftigt sich auch die Arbeitsgruppe um Stendel mit der Untersuchung von Taurolidin und Apoptosevorgängen [21,35]. In einer 2002 veröffentlichten Untersuchung an HT22-Zellen (neuronale Tumorzellen der Maus) quantifizierten sie den Apoptoseanteil über die Messung der Phosphatidylserin-Externalisation. Während unter Kontrollbedingungen 6% der Zellen Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran expremierten, stieg dieser Anteil unter 120 min. Inkubation mit 25 µg/ml (88 µM) auf 25%. Dagegen zeigten gliale und neuronale Zellen aus Rattenfeten keine signifikanten Veränderungen nach Inkubation mit Taurolidin bis zu 2 mg/ml (7 mM). In den Ergebnissen dieser Arbeit wird nicht von einer rückläufigen Apoptoserate bei steigender Konzentration, wie bei McCourt, berichtet. In einer neueren in vitro Arbeit untersuchten Stendel et al. Apoptoseinduktion an weiteren Markern (Fas =

CD95/APO-1). Auch in dieser Untersuchung ist keine Aussage über einen hochdosislimitierten Apoptoseeffekt enthalten.

2002 publizierten Han et al., dass bei HL-60 Zellen (humane Leukämiezellen), die mit Taurolidin inkubiert wurden, Apoptoseinduktion zu beobachten ist. Der Anteil der apoptotischen Zellen sei abhängig von der Taurolidin-Konzentration [19]. Der Bereich maximaler Apoptoseinduktion (>90%) lag bei 150-200 μ M Taurolidin. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht.

Petrovic et al. untersuchten SCC-4 und SCC-15 Zellen (Plattenepithelkarzinomzellen) in vitro [44]. Sie konnten durch Inkubation mit Taurolidin (35 μ M vs. 350 μ M vs. 1,76 mM) an beiden Zellreihen Apoptose bei bis zu 60% der Zellen nachweisen. Die maximale Apoptoserate war bei den SCC-15 Zellen nach 24 Stunden mit 60% bei 350 μ M Taurolidin größer als 45% bei 1,76 mM Taurolidin-Lösung. Die Untersuchung der SCC-4 Zellen ergab keinen Unterschied zwischen beiden Taurolidin-Konzentrationen.

Calabresi et al. berichteten schon 2001 von Apoptosevorgängen in Ovarialkarzinomzellen (PA-1 und SKOV3) nach Inkubation mit Taurolidin [29]. In beiden Zelllinien wurde analog zu Stendel (s.o.) Phosphatidyl-Externalisation via Annexin-V - Bindung nachgewiesen. Signifikante Änderungen konnten bei 50 μ M und 100 μ M (60-80% Apoptose) Taurolidin - Konzentrationen nachgewiesen werden. Auch hier wurden keine höheren Konzentrationen untersucht. Dem Zellexperiment wurde ein Tierexperiment angeschlossen. Zunächst wurde an Mäusen eine Toxizitätsstudie durchgeführt: 5-10 Mäuse pro Gruppe erhielten an drei aufeinander folgenden Tagen 5-30 mg/Maus intraperitoneal als Bolus. Gemessen wurden der Gewichtsverlust und die Mortalität. Bis 15 mg/Maus (650 mg/kg KG) wurden gut vertragen. Bei 30 mg/Maus betrug die Mortalität 100% (bei 25 mg 47%). Für das folgende Experiment wurden eine Dosis von 20 mg/Maus (>800 mg/kg KG) mit 2% Taurolidin gewählt. Syngenetische SKOV-3 Ovarialkarzinomzellen wurden intraperitoneal instilliert. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0-5 Tage post OP) mit einer dreitägigen Bolustherapie mit 2% Taurolidin ip begonnen. Gegenüber der Kontrollgruppe konnte Taurolidin zu allen Zeitpunkten signifikant das Tumorgewicht reduzieren. Die Inzidenz von Metastasen war jedoch nur mit einer frühen Therapie zu senken (80% tumorfreie Tiere bei sofortiger Therapie). Auch hier wurden, wie schon bei der Studie von McCourt besprochen, in beiden

Versuchsreihen unterschiedliche Konzentrationen - „Dimensionen“ untersucht. 2% Taurolidin aus dem Tierexperiment entspricht einer 70 mM Konzentration - der tausendfachen Konzentration im Vergleich zu den Zellexperimenten (50-100 µM).

Die vorgestellten in vitro Studien sind in Tabelle 8 noch einmal zusammengefasst.

Tab. 8: Übersicht von Studien, die den Einfluss von Taurolidin auf Apoptosevorgänge untersuchen

Autor	Jahr	Zellen	untersuchter Dosisbereich	maximale Apoptose
McCourt [20]	2000	DHD/K12/TRb	18 - 88 µM	≤18 µM
Petrovic [44]	2003	SCC-4, SCC-15	350 µM - 1,76 mM	~350 µM<1,76 mM
Stendel [21,35]	2002/3	U373	3,5 µM - 14 mM	bei 88 µM 25%
Han [19]	2002	HL-60	50 - 200 µM	bei 150 µM >90%
Calabresi [29]	2001	SKOV-3	25 - 100 µM	bei 100 µM 60-80%

Fünf Arbeitsgruppen haben Apoptoseinduktion nach Taurolidin-Inkubation feststellen können. Nur in zwei Arbeitsgruppen wurde dieser Effekt durch steigende Dosierung limitiert [20,44]. Abschließend bleibt es unklar, welchen Einfluss hochdosierte lokale Instillationen von Taurolidin auf die Induktion des programmierten Zelltodes haben, da in vitro Experimente andere Konzentrationsbereiche untersucht wurden, als in den Tierversuchen verabreicht wurden. Weitere in vitro - Experimente müssen zeigen, ob Unterschiede zwischen DHD/K12/TRb - Zellen und anderen Tumorentitäten existieren und ob auch millimolare Konzentrationen zur Apoptoseinduktion beitragen, um beurteilen zu können, mit welcher Relevanz die beobachteten Apoptosephänomene zur Erklärung der intraperitonealen Wirksamkeit von Taurolidin beitragen. Letztendlich besteht unter den Autoren der Konsens, dass die Apoptose nur einen Teil der Wirksamkeit zu erklären vermag.

5.4 Taurolidin als antiadhärente Substanz

Neben der Induktion des programmierten Zelltodes ist Taurolidin als antiadhärente und zytokinmodulierende Substanz bekannt [13]. Die antiadhärenten Eigenschaften sind durch die biochemische Struktur belegt: Taurolidin wird aus der nicht essentiellen Aminosulfonsäure Taurin (Aminoethylsulfonsäure) synthetisiert. In

Lösung liegt Taurolidin im Gleichgewicht mit seinen Metaboliten Taurultam und Methyloltaurultam vor, welche als Überträger von Methylolgruppen fungieren. Die aktiven Gruppen sind in der Lage, Bakterienzellwände per Methylierung zu vernetzen. Darüber hinaus inaktivieren sie bakterielle Endotoxine und Exotoxine. Pro Molekül Taurolidin können drei aktive Methylolgruppen übertragen werden. Die Endprodukte des enzymatischen Abbaus sind Kohlenstoffdioxid und Taurin [13]. Taurin entsteht im menschlichen Stoffwechsel auch aus Cystein durch schrittweise Oxidation der -SH Gruppe und anschließender Decarboxylierung. Die Plasmakonzentration im postabsorptiven Zustand beträgt bei normalen Testpersonen $51 \pm 3 \mu\text{M}$ [45].

Der Einfluss auf die Adhärenz von Bakterien in der Bauchhöhle stellt u.a. die Indikation für die topische Behandlung bei der eitrigen Peritonitis. Per Peritoneallavage und intravenös können Bakterien und deren Toxine inaktiviert werden [12]. Analog zu diesem Mechanismus kann Taurolidin auch Tumorzellen an der Adhäsion hindern, dem ersten Schritt von der freien vitalen Tumorzelle zur Metastase. In vitro Versuche belegen, dass sich in Taurolidin inkubierte Zellen von der Unterlage lösen und frei in der Lösung schweben. Nach 72h Inkubation mit 50-100 μM Taurolidin verloren 50-80% der Zellen ihre Fähigkeit an Oberflächen zu haften [43].

Es ist schon seit den 70er Jahren in Diskussion, dass die Implantation von Tumorzellen auf epithelialen Läsionen mit freiliegender Interzellulärsubstanz ein wesentlich effizienterer Prozess ist, als auf Oberflächen mit intakter Basalmembran [33,46]. Insbesondere bei intraabdominellen Eingriffen sind Läsionen der Peritonealoberfläche Prädilektionsstellen für Tumorzelladhäsion. In mehreren tierexperimentellen Studien konnte das chirurgische Trauma als wichtiger Faktor zur Genese von Lokalrezidiven isoliert werden:

Van den Tol et al. konnten 1998 an einem Rattenmodell einen Zusammenhang zwischen peritonealem Trauma und Tumorzellimplantation belegen [33]. An weiblichen WAG - Ratten wurden am Uterus standardisierte Mesothel-Läsionen unterschiedlichen Ausmaßes gesetzt. Bei den Kontrolltieren wurde das Peritoneum nicht berührt. Anschließend wurden CC-531 Zellen (mäßig differenziertes syngenetisches Kolon-Adenokarzinom) ip instilliert. Drei Wochen später wurde der Cancer-Index nach Steller bestimmt: Die meisten Metastasen konnten an den

Peritonealläsionen gefunden werden. Es wurde festgestellt, dass die Ratten mit stärkeren Läsionen auch mehr Metastasen an anderen Organen aufwiesen. In einem weiteren Experiment wurde daraufhin ein solider Tumor subkapsulär in beiden Nieren implantiert. Drei Tage nach der Operation erfolgten im Rahmen eines Zweiteingriffes isolierte standardisierte Mesothel-Läsionen wie im ersten Experiment. Die Gruppe mit peritonealer Traumatisierung wies ein stärkeres Tumorwachstum auf, als die Kontrollgruppe. Die Autoren stellten ein Modell der biphasischen Wirkung eines chirurgischen Traumas auf: In der ersten Phase führt die Traumatisierung des Bauchfells und die lokale unspezifische Inflamationsreaktion zu einer Zunahme von Adhäsionsmolekülen, die das Anbinden von Tumorzellen vermitteln. Sekundär führen die im Zuge des peritonealen Heilungsprozesses freigesetzten Wachstumsfaktoren auch zu einer Wachstumsstimulation der adhären Tumorzellen. Somit wären auch kurze Remissionszeiten bei präoperativem M0 Status über eine postoperative Wachstumsstimulation von präklinischen, schon bestehenden Metastasen erklärbar.

Die Ergebnisse unserer Arbeit geben Hinweise, dass Taurolidin in hohen Dosen subkutan Tumorwachstum - disseminierte Filiae - durch Infusionstherapie hemmen könnte. Möglicherweise beeinflusst Taurolidin hier die zweite Phase des Modells von van den Tol und bewirkt über systemische Zytokinmodulation (siehe Kapitel 5.6) eine Verminderung des Wachstumsreizes. In unserem Tiermodell erfolgte das peritoneale Trauma zum einen durch einen 4 cm langen Bauchschnitt, zum anderen durch Eventeration des Intestinums, so dass die Oberfläche an der Luft antrocknen konnte. Die somit geschaffene mesotheliale Läsion diente im Sinne der 1. Phase des Modells (van den Tol) als Adhäsionsfläche für die Tumorzellen. Die intravenöse Injektion war hier gegenüber einer ip Injektion von Taurolidin bei früheren Studien [20,23,24,25,26,27,28,29,30,34,38,39,40] nicht in der Lage, das Tumorwachstum zu hemmen. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass die gute Wirksamkeit bei lokaler Applikation von Taurolidin in der Bauchhöhle zu großen Teilen durch Inaktivierung der o.g. Adhäsionsmoleküle vermittelt wird. Offenbar bedingt die Kinetik von Taurolidin nach intravenöser Applikation eine unzureichende intraperitoneale Konzentration aufgrund von Metabolisierung und Bindung an Plasmaproteine. Studien, die die intraperitoneale Konzentration nach intravenöser Applikation untersucht haben, liegen bisher nicht vor.

Diverse Studien haben die antiadhärenten Eigenschaften experimentell belegt.

[24,27,29,34] Vielfach wurde ein zur antiadhärenten Substanz Heparin synergistischer Effekt beobachtet:

Volz et al. untersuchten die tumorinduzierte Letalität nach Pneumoperitoneum in einem Maus - Modell [34]. An 78 Mäusen wurde eine Woche nach intraperitonealer Etablierung eines Ovarialzellkarzinoms eine Laparoskopie mit Kohlenstoffdioxid - Insufflation vorgenommen. Unmittelbar danach und 48h später wurden die Tiere mit verschiedenen Pharmaka intraperitoneal (u.a. der Kombination aus Taurolidin und Heparin) behandelt. 78 Kontrolltiere erhielten die Zellen und die Medikamente ohne Laparoskopie. Das chirurgische Trauma führte zu einer Verkürzung der postoperativen Überlebenszeit. Die frühe Gabe von Taurolidin/Heparin konnte diesen Effekt jedoch teilweise kompensieren. Die Autoren führen das auf die Bindung von freien Domänen der Extrazellulärmatrix durch Taurolidin / Heparin zurück.

Jacobi et al. postulierten in zwei Arbeiten eine synergistische Wirkung von Taurolidin und Heparin [23,24]: 1997 berichteten sie über die Ergebnisse eines Tierversuches mit BD-IX Ratten und syngenetischen Tumorzellen (DHD/K12/TRb): 60 Tiere wurden in 4 Gruppen randomisiert und erhielten nach Etablierung eines Pneumoperitoneums die Tumorzellen + 1) Heparin vs. 2) Taurolidin vs. 3) der Kombination aus Heparin und Taurolidin vs. 4) Tumorzellen ohne Zusatz zur Positivkontrolle. Das Tumorstadium der Kontrollgruppe war am größten und wurde durch Heparin ($p < 0,01$) und Taurolidin ($p < 0,001$) gehemmt. Die Kombination beider Stoffe resultierte in einer noch stärkeren Hemmung des Tumorstadiums ($p < 0,0001$). Der Autor führt dies auf eine mögliche Hemmung der Bindung von Tumorzellen, an die Extrazellulärmatrix des Wirtes zurück. Darüber hinaus werden auch andere Mechanismen angeführt die später im Text diskutiert werden.

In einem ähnlichen Modell wurde 1999 der Einfluss verschiedener Laparoskopiegase und verschiedener Substanzen (Taurolidin vs. Taurolidin + Heparin vs. PVP-Jod vs. Ringer-Lsg) auf das Tumorstadium untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass Taurolidin und Taurolidin + Heparin das intraperitoneale Tumorstadium im Sinne eines synergistischen Effektes hemmen können. [27]

Zusammenfassend bestätigen diese Arbeiten, dass ein wesentlicher Teil der Wirksamkeit von Taurolidin über die Methylierung freier Domänen der Extrazellulärmatrix, insbesondere an Stellen mit verletzter Basalmembran vermittelt

wird. Hierzu ist ein direkter Kontakt von Taurolidin mit der Peritonealoberfläche notwendig. Es muss aufgrund der differierenden Ergebnisse der ip und iv - Studien als unwahrscheinlich angesehen werden, dass eine intravenöse Applikation ausreichende intraperitoneale Wirkspiegel induzieren kann. Somit eignete sich in unserem Experiment weder die systemische Bolus-Applikation (Gruppe B) noch die einwöchige Infusionstherapie (Gruppe A) für eine peri/postoperative Chemoprophylaxe im Sinne der Verhinderung der Adhäsion freier Tumorzellen. Eine perioperative Lavage zur Prophylaxe lokoregionärer Rezidiverkrankungen ist aufgrund der tierexperimentellen Datenlage belegt und wird derzeit im Rahmen einer prospektiv randomisierten Multicenter-Studie mit Evidenzgrad 1b am Menschen validiert.

5.5 Taurolidin neutralisiert bakterielles Endotoxin (LPS) - als tumorproliferative Substanz

Ähnlich wie van den Tol suchten Pidgeon et al. 1999 nach möglichen Faktoren für ein verstärktes Wachstum von schon angelegten, jedoch nicht nachweisbaren Metastasen in Folge chirurgischer Eingriffe [36]. In einem Tierexperiment an BALB/c Mäusen mit etablierten Tumoren konnte ein ursächlicher Zusammenhang zu Endotoxinen und Lipopolysacchariden (LPS) hergestellt werden: Ausgangspunkt für die Studie war die These, dass die offene Bauchchirurgie und Laparoskopie mit Raumluft lokale Inflammationsreaktionen hervorrufen. Diese werden durch in der Luft ubiquitär vorhandene Bakterien und deren Toxine, sowie durch die Darmflora vermittelt.

8 Tiere pro Gruppe erhielten zwei Wochen präoperativ Tumorzellinjektionen in die laterale Schwanzvene. Zwei Wochen später wurde je 8 Tieren pro Gruppe a) ein chirurgisches Trauma zugefügt, oder b) LPS als bakterielles Toxin ip appliziert. 5 Tage nach Intervention wurden die Tiere obduziert und das Tumorstadium bestimmt.

Sowohl in der Laparoskopie-, als auch in der Laparotomiegruppe lagen das Gesamtstumorstadium und die Serum-LPS/VEGF-Spiegel über denen der Kontrollgruppe ohne chirurgische Intervention. In der Laparoskopiegruppe mit CO₂-Insufflation statt Raumluft waren die Parameter nicht von der Kontrollgruppe verschieden. Endotoxininjektionen (LPS) führten zu höherem Tumorstadium gegenüber Kochsalzinjektionen. Die Ergebnisse waren mit denen der chirurgischen

Interventionen vergleichbar. Weitere Parameter wie VEGF, Mitoseindex, Apoptoseindex unterstützten die o.g. Ergebnisse. Zusammenfassend konnte gezeigt werden dass im Zuge einer chirurgischen Intervention Endotoxin in den systemischen Kreislauf übergeht und über eine Stimulation der Tumorzellen zu Proliferation, VEGF-Produktion, sowie der Suppression von Apoptosevorgängen führt. Damit sind bakterielle Toxine ursächlich in das Phänomen des erhöhten Tumorwachstums nach chirurgischen Eingriffen eingebunden [36]. In weiteren in vitro Arbeiten konnte der Wirkmechanismus weiter analysiert und mit CD14, NF-kappaB, Bildung von beta(1)-Integrinen und einer somit geförderten Tumorzelladhäsion und Invasion in ursächlichen Zusammenhang gebracht werden [47]. Eine weitere Untersuchung LPS blockierender Antikörper in vivo ist geplant.

Ein wesentlicher Bestandteil der Behandlungsindikation für Taurolidin in der septischen Chirurgie und bei schweren systemischen Infektionen wie der Peritonitis oder Sepsis ist die nachgewiesene Kompetenz, bakterielle Endo- und Exotoxine als einen wichtigen Faktor in der Pathogenese des septischen Schockes zu neutralisieren [13]. Die chemische Inaktivierung von Toxinen durch Taurolidin beruht teilweise auf der inter- und intramolekularen Vernetzung des LPS-Protein-Komplexes durch Methylolgruppen [12]. In verschiedenen Tiermodellen wurde LPS ip als Modell für eine experimentelle Peritonitis bei Mäusen und Kaninchen eingesetzt. Der Parameter für die Toxizität war die Veränderung der Körpertemperatur und Letalität. Bei in vitro Vorinkubation mit Taurolidin allein konnte die Toxizität von LPS nicht gesenkt werden. Nach Zugabe von Mäuseplasma zu LPS und Taurolidin konnte die Toxizität auf $\frac{1}{4}$ gesenkt werden. Es scheint, dass für die in vitro Übertragung der Methylolgruppen enzymatische Prozesse notwendig sind [12].

Gardinger et al. untersuchten 1994 an einem Tiermodell der Ratte u.a. den Einfluss von Taurolidin iv auf Endotoxinspiegel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Hierbei konnte durch intravenöses Taurolidin die systemische Endotoxinämie gegenüber der Kontrollgruppe mit Kochsalz iv gesenkt werden ($p=0,008$) [17]. 1996 wurden durch Rosman et al. 30 Ratten einer experimentellen bakteriellen Peritonitis unterzogen. Anschließend wurden sie u.a. mit Taurolidin ip therapiert. Die im Verlauf gemessenen lokalen- (ip) und Plasmaendotoxinspiegel lagen signifikant unter denen der anderen Gruppen (Kochsalz) [48].

Taurolidin stellt somit eine Angriffsmöglichkeit an der Schnittstelle zwischen zwei

Krankheitsentitäten - der Infektiologie und der Onkologie dar. Der direkte Einfluss von Taurolidin auf LPS-stimuliertes Tumorwachstum wurde bisher nach unserer Kenntnis weder in vitro, noch in vivo untersucht. Eine direkte experimentelle Anwendung an dem Modell von Pidgeon et al. [36] könnte jedoch Aufschluss darüber bringen, ob eine präoperative systemische Applikation von Taurolidin die intraoperative Endotoxinämie neutralisieren und somit tumorwachstumsfördernde Effekte der Chirurgie prophylaktisch und kausal vermeiden kann. Eine kombinierte Therapie aus präoperativer Infusion und perioperativer ip Bauchspülung könnte ein mögliches Regime in der klinischen Anwendung zur Prophylaxe lokoregionärer Metastasen und Fernmetastasen sein.

5.6 Taurolidin als Modulator der Interaktionen von Zytokinen

Ein weiteres Feld von Interaktionen zwischen Infektion und Tumorwachstum stellen Zytokine dar. Botenstoffe wie IL-1 β und TNF- α sind potente Wachstumsfaktoren. Die wachstumsstimulierende Wirkung konnte an diversen Zelllinien nachgewiesen werden [25]. Darüber hinaus vermittelt IL-1 die Freisetzung verschiedener anderer Wachstumsfaktoren über eine Stimulation von peritonealen Mesothelzellen (granulocyte colony-stimulating factor (CSF), granulocyte-monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 (IL-1) und IL-6) [49]. Diese Wachstumsfaktoren vermitteln einerseits physiologische Entzündungsprozesse und Regeneration, stellen andererseits jedoch auch einen Wachstumsstimulus für Tumorzellen dar.

Im vorhergehenden Kapitel wurde die These belegt, dass Taurolidin durch chemische Vernetzung bakterielle Endotoxine inhibieren kann. 1991 konnte von Bedrosian et al. nachgewiesen werden, dass dies nicht zur Erklärung des Wirkeffektes ausreicht [37]:

Untersucht wurden Makrophagenkulturen in vitro (PBMC), die mit LPS (vorinkubiert mit Taurolidin) stimuliert wurden. Gemessen wurden IL-1 β und TNF- α als Zielbotenstoffe, die von den Makrophagen zur Vermittlung des Entzündungsreizes sezerniert werden. Entsprechend den Erwartungen konnte eine dosisabhängige Reduktion der Zytokine beobachtet werden. Allerdings war es hierfür unerheblich, in welchem molaren Verhältnis LPS und Taurolidin inkubiert wurden. Vielmehr bestand ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Reduktion der Zytokine und der Konzentration von Taurolidin in der Makrophagenkultur. Bei einer Konzentration zwischen 40-100 $\mu\text{g/ml}$ (140-350 μM) betrug die Reduktion der Zytokine 80-90%. In

einem weiteren Experiment wurden zunächst die Makrophagenkulturen für 30 min. mit Taurolidin vorinkubiert, vom Taurolidin gewaschen und anschließend mit LPS stimuliert. Auch in dem veränderten Versuchsaufbau konnte die Synthese von IL-1 und TNF gehemmt werden [37]. Zelltod als Ursache für die Suppression konnte mit einem LDH-Kit ausgeschlossen werden. Die Konzentration von 350 μ M war für PBMC-Zellen nicht zytotoxisch. Darüber hinaus konnten Bedrosian et al. auch für Exotoxine eine Suppression der Zytokinkonzentrationen nachweisen.

Der beschriebene Effekt konnte auch an anderen Zelllinien experimentell belegt werden: In der schon erwähnten Studie von Rosman et al. [48] (s.o) wurde durch Taurolidin ip auch der TNF-Spiegel lokal in der Bauchhöhle und im Blutplasma gesenkt. Ursache sind wahrscheinlich Peritonealmakrophagen (PM), deren Sekretionsleistung durch Taurolidin gehemmt wurde. PM wurden auch von Jacobi et al. untersucht [25]: Per Peritoneallavage wurden PM bei Ratten isoliert und in vitro mit Taurolidin inkubiert. Dadurch wurde die IL-1 β Produktion reduziert. Eine spätere Stimulation mit LPS führte zu keinem signifikanten Anstieg der IL-1 β Sekretion.

Leithauser et al. beobachteten 1997 eine Hemmung der TNF- α Freisetzung von Mesangiumzellen der Ratte unter Taurolidin - Inkubation [50]. Dofferhof et al. haben in vitro Escherichia coli mit Antibiotika inkubiert und die Freisetzung von TNF- α durch Monozyten (stimuliert durch freiwerdende Bakterientoxine) gemessen. Die Inkubation mit Taurolidin konnte einen Anstieg von TNF- α bei Antibiose verhindern. Die Autoren führen dies auf die Endotoxin-Neutralisierung zurück [51]. Dennoch ist die Wirkung sicher auch unter dem Aspekt einer direkten Suppression der Zytokin-Sekretionsleistung der Monozyten zu diskutieren.

Watson et al. postulierten 1995 einen gegensätzlichen Effekt: In einer Reihe von in vitro und in vivo - Versuchen konnte gezeigt werden, dass Taurolidin Peritonealmakrophagen zu verstärkter Abwehrleistung stimuliert haben und Parameter wie TNF- α - Sekretion ansteigen [52].

In Zellversuchen mit PM wurde nach Inkubation mit LPS und Taurolidin eine Steigerung der TNF- α Produktion ermittelt. Anschließend Tierversuche mit CD-1 Mäusen erbrachten ähnliche Ergebnisse: Nach medianer Laparotomie erfolgte eine Ligatur des Zäkums distal des ileozäkalen Übergangs. Mit einer Nadel wurde das Zäkum zweiseitig perforiert. Anschließend erfolgte der Bauchdeckenverschluss und

Therapie mit Taurolidin (200 mg/kg KG ip) vs. Kochsalzlösung. 24h post op erfolgte eine Lavage mit 6 ml PBS, um die Peritonealmakrophagen zu gewinnen. Die folgende Untersuchung entsprach den Untersuchungen der Zellexperimente und ergab äquivalente Ergebnisse. Der Autor schreibt Taurolidin eine Makrophagen-aktivierende Eigenschaft zu, welche eine mit Steigerung der Phagozytose und TNF- α Sekretion bewirkt. Die Ergebnisse von Bedrosian et al. aus dem Jahre 1991 [37] werden in der Arbeit nicht erwähnt, so dass eine höchst kontroverse Situation resultiert.

In einem allgemeinen Konsensus wird in der aktuellen Literatur jedoch mehrheitlich von einer negativen Zytokinbilanz durch Taurolidin ausgegangen und mit der Arbeit von Bedrosian belegt [13,21,23,24,25,26,27,28,29,30,34,40,53]. Unter dem Aspekt eines verminderten Tumorwachstums erscheint eine Zytokin-hemmende Wirkung, welche mit dem Ausbleiben der Wachstumsstimulation durch Zytokine, wie IL-1 β und TNF- α einhergeht, als adäquate Erklärung. Die Ergebnisse von Watson und ihre Relevanz auf das Tumorwachstum bedürfen weiterer Abklärung.

5.7 Intrazelluläre Wirkmechanismen von Taurolidin

Experimentelle Studien konnten Hinweise für Zusammenhänge zwischen Taurolidinwirkung und Apoptose herstellen [19,20,21,29,35] (siehe Kapitel 5.3). Der Mechanismus ist noch unklar. Aufgrund vorliegender Studien ist davon auszugehen, dass Taurolidin über die Wirkung an den Oberflächenrezeptoren hinaus auch eine intrazelluläre Wirkkomponente besitzt. Die geringe Molekülgröße und fehlende Ladung ermöglicht eine intrazelluläre Aufnahme in prokaryotische und eukaryotische Zellen. Braumann et al. konnten in molekularbiologischen Experimenten ein intrazelluläres Vorkommen von Taurolidin über einen Eingriff in die zelluläre Proteinbiosynthese nachweisen [54]. In diesen Versuchen führte die Inkubation mit Taurolidin zu einer Reduktion der Zytokine TNF- α und VEGF (vascular endothelial growth factor). Darüber hinaus konnte eine Suppression der Transkriptionsfaktoren I κ B, c-Jun und des Vorläuferpeptides p105, sowie von Vertretern des Zellzyklus (p53, p27) nachgewiesen werden. Dies führt bei Tumorzellen, die mit Taurolidin inkubiert wurden, zu verringerter Sekretion des Tumornekrosefaktors alpha, sowie einer verringerten Synthese des tumoreigenen VEGF. Somit könnte ein therapeutischer Ansatz mit Taurolidin die Neovaskularisation, welche eine Schlüsselstellung in der Entwicklung einer Metastase einnimmt, inhibieren. Der Transkriptionsfaktor NF-kB

reguliert die Übertragung der Zellkern-DNA auf m-RNA, somit auch die Expression von Genen, die den Zellzyklus, Inflammation, Tumorgenese und Apoptose steuern. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Taurolidin zu verminderten NF- κ B - Spiegeln führt. Somit stehen der Zelle wichtige Regulator- und Strukturproteine nicht mehr ausreichend zu Verfügung.

Auch wenn die bisherigen Ergebnisse nur Hinweise auf intrazelluläre Wirkmechanismen geben und deren Konsequenz auf eine mögliche Optimierung einer systemischen Therapie noch nicht hinreichend erklären können, so gibt der Nachweis des Eingriffs von Taurolidin auf intrazelluläre Regelkreisläufe Grund zur weiteren Erforschung der Möglichkeiten, Taurolidin in der Therapie maligner Neoplasien auch systemisch einsetzen zu können. Über diesen Einsatz könnte sich dann ein weiteres Anwendungsgebiet - in der neoadjuvanten Tumorthherapie und in der palliativen Onkologie ergeben.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Taurolidin ist eine antiadhärente, zytokinmodulierende, Apoptose - induzierende und Bakterientoxin - neutralisierende Substanz, die in vitro und in vivo das Wachstum von Tumorzellen supprimiert. Es liegen Hinweise für Apoptoseinduktion vor. Weitere Studien belegen die antineoplastische Wirksamkeit durch Reduktion des chirurgischen Traumas auf infektiologischer / Zytokin-Ebene. Neue Arbeiten belegen auch intrazelluläre Wirkmechanismen mit Einfluss auf Regulator- und Strukturproteine der Zelle [54].

Eine intravenöse intermittierende Infusionstherapie mit hohen Taurolidin-Konzentrationen (3%) konnte in unserer Arbeit in der Subkutis die Anzahl der Metastasen reduzieren. Für eine intraperitoneale Tumorsuppression durch intravenöse Applikation konnte in unserer Studie kein Hinweis gefunden werden. Darüber hinaus konnte in dem vorliegenden Experiment eine gute Verträglichkeit nachgewiesen werden. Selbst in hohen Konzentrationen von 3% (480 mg/kg KG/die) waren Nebenwirkungen wie Gewichtsverlust, erhöhte Mortalität und Veränderungen des peripheren Blutbildes im Sinne einer Knochenmarksfunktionseinschränkung nicht zu beobachten. 3% Lösung ist aufgrund mangelhafter Stabilität nur kurzfristig haltbar.

Aus dem aktuellen Literaturüberblick ergeben sich drei mögliche klinische Anwendungsbereiche, deren Wirksamkeit durch entsprechende Studien belegt

werden sollte:

- **Postoperative intraperitoneale Spülung mit 1,5l 0,5% Taurolidinlösung** bei tumorchirurgischen Eingriffen. Tierexperimentell ist eine Wirksamkeit gut belegt. Derzeit erfolgt eine prospektiv randomisierte Multicenter-Studie für den klinischen Einsatz am Menschen.
- **Präoperative intravenöse Infusion mit Taurolidinlösung** zur Abschirmung perioperativer bakterieller Toxinausschüttungen, die laut tierexperimentellen Ergebnissen vermehrtes Tumorwachstum zur Folge haben könnten. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit und Dosis- und Zeitpunktfindung liegen bisher noch nicht vor.
- **Intravenöse intermittierende Infusionstherapie mit Taurolidinlösung** zur Therapie manifester Tumoren oder Metastasen unter neoadjuvanten oder palliativem Aspekt. Erste in vitro Versuche über Apoptoseinduktion und andere intrazelluläre Angriffspunkte liegen vor. Weitere in vivo Tierexperimente können Aufschluss darüber geben, ob eine intermittierende iv Infusionstherapie bei manifesten, vaskularisierten Tumoren wirksam ist.

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine intraperitoneale Applikationsform im Sinne einer postoperativen Bauchspülung für die Prävention lokoregionärer Rezidive bessere Wirksamkeit zeigt, als andere Applikationsformen. Aufgrund der Hinweise für Apoptose und intrazelluläre Wirkmechanismen von Taurolidin muss in weiteren tierexperimentellen Studien gezeigt werden, ob ein späteres Einsetzen der Therapie - nach Bildung von soliden, vaskularisierten Tumorknoten - möglicherweise eine bessere Erreichbarkeit der Tumorzellen durch das Therapeutikum ermöglicht. Darüber hinaus sollte der Stellenwert intrazellulärer Wirkmechanismen in weiteren Zellexperimenten validiert werden, um eine optimale iv Dosisfindung zu ermöglichen. Ein möglicher Einsatz in der palliativen Medizin ist nach dem Nachweis einer iv Wirksamkeit aufgrund geringer Toxizität anzustreben. Hier ist auch die Entwicklung einer oralen Therapie zu erwägen (am Tiermodell erfolgten bereits orale Gaben im Zusammenhang mit Toxizitätsstudien [12]).

Taurolidin ist ein nebenwirkungsarmes Chemotherapeutikum, dessen Anwendungsgebiet sich von der antimikrobiellen Therapie zum rezidivprophylaktischen Einsatz in der Onkochirurgie erweitert hat. Teilerfolge in der

systemischen Therapie [42] und eine Reihe von Fallberichten über erfolgreichen Einsatz bei austherapierten Tumorkranken [13] rechtfertigen eine weitere wissenschaftliche Erörterung anderer Therapieformen, als die der topischen Instillation.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
BE	Blutentnahme
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CSF	granulocyte colony-stimulating factor
°C	Grad Celsius
IL	Interleukin
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
µl	Mikroliter
MHK	minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Salinelösung
PM	Peritonealmakrophagen
p-Wert	Signifikanzniveau p
sc	subkutan
Tab.	Tabelle
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRD	Taurolidin
UAW	unerwünscht Arzneimittelwirkungen
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs	versus

Literaturverzeichnis

- [1] Senn HJ; Drings P; Glaus A; Jungi F; Pralle HB; Sauer R und Schlag PM (2003): Onkologie, 5., neu überarbeitete Auflage. edition , Thieme.
- [2] Dt.Krebsgesellschaft: (2002): Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002.
- [3] Cava, A.; Roman, J.; Gonzalez, Quintela A.; Martin, F. und Aramburo, P. (1990): Subcutaneous metastasis following laparoscopy in gastric adenocarcinoma, European Journal of Surgical Oncology 16 [1], pp. 63-67. URL: PM:2155140
- [4] Clair, D. G.; Lautz, D. B. und Brooks, D. C. (1993): Rapid development of umbilical metastases after laparoscopic cholecystectomy for unsuspected gallbladder carcinoma, Surgery 113 [3], pp. 355-358. URL: PM:7772085
- [5] Fusco, M. A. und Paluzzi, M. W. (1993): Abdominal wall recurrence after laparoscopic-assisted colectomy for adenocarcinoma of the colon. Report of a case, Diseases of the Colon and Rectum 36 [9], pp. 858-861. URL: PM:8397078
- [6] Wexner, S. D. und Cohen, S. M. (1995): Port site metastases after laparoscopic colorectal surgery for cure of malignancy, British Journal of Surgery 82 [3], pp. 295-298. URL: PM:7795990
- [7] Hewett, P. J.; Texler, M. L.; Anderson, D.; King, G. und Chatterton, B. E. (1999): In vivo real-time analysis of intraperitoneal radiolabeled tumor cell movement during laparoscopy, Diseases of the Colon and Rectum 42 [7], pp. 868- 875. URL: PM:10411432
- [8] Gutt, C. N.; Riemer, V.; Kim, Z. G.; Erceg, J. und Lorenz, M. (2001): Impact of laparoscopic surgery on experimental hepatic metastases, British Journal of Surgery 88 [3], pp. 371-375. URL: PM:11260101
- [9] Ruoslahti, E. und Pierschbacher, M. D. (1987): New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, Science 238 [4826], pp. 491-497 . URL: PM:2821619
- [10] Carter, J. J. und Whelan, R. L. (2001): The immunologic consequences of laparoscopy in oncology, Surgical Oncology Clinics of North America 10 [3], pp. 655-677. URL: PM:11685934
- [11] Goldstein, D. S.; Lu, M. L.; Hattori, T.; Ratliff, T. L.; Loughlin, K. R. und Kavoussi,

- L. R. (1993): Inhibition of peritoneal tumor-cell implantation: model for laparoscopic cancer surgery, *Journal of Endourology* 7 [3], pp. 237-241. URL: PM:8358421
- [12] Pfirrmann RW (1985): Einführung und Übersicht, Brückner WL und Pfirrmann RW, *Taurolin - Ein neues Konzept zur antimikrobiellen Chemotherapie chirurgischer Infektionen*, pp. 3-23, Urban & Schwarzenberg .
- [13] Jacobi, C. A.; Bouchier-Hayes, D.; Braumann, C.; Brock, M.; Pfirrmann, R. W.; Redmond, H. P.; Sookhai, S.; Stendel, R.; Stoltenburg-Didinger, G.; O'Sullivan, M. J. und Reith, H. B. (2003): *Taurolidin in der Tumorthherapie - Vorstellung eines neuen Therapiekonzeptes*, 1. edition, UNI-MED Science, ISBN: 3-89599-677-7.
- [14] Jurewitsch, B.; Lee, T.; Park, J. und Jeejeebhoy, K. (1998): Taurolidine 2% as an antimicrobial lock solution for prevention of recurrent catheter-related bloodstream infections, *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.* 22 [4], pp. 242-244. URL: PM:9661127
- [15] Staubach, K. H. (1997): [Adjuvant therapy of peritonitis with taurolidine. Modulation of mediator liberation], *Langenbecks Arch.Chir* 382 [4 Suppl 1], pp. S26-S30. URL: PM:9333704
- [16] Bieselt, R. (1997): [Surgical therapy of pleural empyema with taurolidine], *Langenbecks Arch.Chir* 382 [4 Suppl 1], pp. S42-S46. URL: PM:9333707
- [17] Gardiner, K. R.; Anderson, N. H.; McCaigue, M. D.; Erwin, P. J.; Halliday, M. I. und Rowlands, B. J. (1994): Enteral and parenteral anti-endotoxin treatment in experimental colitis, *Hepatogastroenterology* 41 [6], pp. 554-558. URL: PM:7721244
- [18] Allon, M. (2003): Prophylaxis against dialysis catheter-related bacteremia with a novel antimicrobial lock solution, *Clinical Infectious Diseases* 36 [12], pp. 1539-1544. URL: PM:12802753
- [19] Han, Z.; Ribbizi, I.; Pantazis, P.; Wyche, J.; Darnowski, J. und Calabresi, P. (2002): The antibacterial drug taurolidine induces apoptosis by a mitochondrial cytochrome c-dependent mechanism, *Anticancer Research* 22 [4], pp. 1959-1964. URL: PM:12174870
- [20] McCourt, M.; Wang, J. H.; Sookhai, S. und Redmond, H. P. (2000): Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo, *Annals of Surgical Oncology* 7 [9], pp. 685-691. URL: PM:11034247

- [21] Stendel, R.; Stoltenburg-Didinger, G.; Al Keikh, C. L.; Wattrodt, M. und Brock, M. (2002): The effect of taurolidine on brain tumor cells, *Anticancer Research* 22 [2A], pp. 809-814. URL: PM:12014655
- [22] Ribizzi, I.; Darnowski, J. W.; Goulette, F. A.; Akhtar, M. S.; Chatterjee, D. und Calabresi, P. (2002): Taurolidine: preclinical evaluation of a novel, highly selective, agent for bone marrow purging, *Bone Marrow Transplantation* 29 [4], pp. 313-319. URL: PM:11896428
- [23] Jacobi, C. A.; Peter, F. J.; Wenger, F. A.; Ordemann, J. und Muller, J. M. (1999): New therapeutic strategies to avoid intra- and extraperitoneal metastases during laparoscopy: results of a tumor model in the rat, *Digestive Surgery* 16 [5], pp. 393-399. URL: PM:10567800
- [24] Jacobi, C. A.; Ordemann, J.; Bohm, B.; Zieren, H. U.; Sabat, R. und Muller, J. M. (1997): Inhibition of peritoneal tumor cell growth and implantation in laparoscopic surgery in a rat model, *American Journal of Surgery* 174 [3], pp. 359-363. URL: PM:9324156
- [25] Jacobi, C. A.; Sabat, R.; Ordemann, J.; Wenger, F.; Volk, H. D. und Muller, J. M. (1997): [Peritoneal instillation of taurolidine and heparin for preventing intraperitoneal tumor growth and trocar metastases in laparoscopic operations in the rat model], *Langenbecks Arch.Chir* 382 [4 Suppl 1], pp. S31-S36. URL: PM:9333705
- [26] Braumann, C.; Ordemann, J.; Wildbrett, P. und Jacobi, C. A. (2000): Influence of intraperitoneal and systemic application of taurolidine and taurolidine/heparin during laparoscopy on intraperitoneal and subcutaneous tumour growth in rats, *Clinical and Experimental Metastasis* 18 [7], pp. 547-552. URL: PM:11688959
- [27] Jacobi, C. A.; Wildbrett, P.; Volk, T. und Muller, J. M. (1999): Influence of different gases and intraperitoneal instillation of antiadherent or cytotoxic agents on peritoneal tumor cell growth and implantation with laparoscopic surgery in a rat model, *Surgical Endoscopy* 13 [10], pp. 1021-1025. URL: PM:10526040
- [28] Da Costa, M. L.; Redmond, H. P. und Bouchier-Hayes, D. J. (2001): Taurolidine improves survival by abrogating the accelerated development and proliferation of solid tumors and development of organ metastases from circulating tumor cells released following surgery, *Journal of Surgical Research* 101 [2], pp. 111-119. URL:

PM:11735264

[29] Calabresi, P.; Goulette, F. A. und Darnowski, J. W. (2001): Taurolidine: cytotoxic and mechanistic evaluation of a novel antineoplastic agent, *Cancer Research* 61 [18], pp. 6816-6821. URL: PM:11559556

[30] Wenger, F. A.; Kilian, M.; Braumann, C.; Neumann, A.; Ridders, J.; Peter, F. J.; Guski, H. und Jacobi, C. A. (2002): Effects of taurolidine and octreotide on port site and liver metastasis after laparoscopy in an animal model of pancreatic cancer, *Clinical and Experimental Metastasis* 19 [2], pp. 169-173. URL: PM:11964081

[31] Humphries, M. J.; Olden, K. und Yamada, K. M. (1986): A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells, *Science* 233 [4762], pp. 467-470. URL: PM:3726541

[32] Whalen, G. F. und Ingber, D. E. (1989): Inhibition of tumor-cell attachment to extracellular matrix as a method for preventing tumor recurrence in a surgical wound, *Annals of Surgery* 210 [6], pp. 758-764. URL: PM:2686568

[33] van den Tol, P. M.; van Rossen, E. E.; van Eijck, C. H.; Bonthuis, F.; Marquet, R. L. und Jeekel, H. (1998): Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze leads to less implantation metastasis of spilled tumor cells, *Annals of Surgery* 227 [2], pp. 242-248. URL: PM:9488523

[34] Volz, J.; Volz-Koster, S.; Kanis, S.; Klee, D.; Ahlert, C. und Melchert, F. (2000): Modulation of tumor-induced lethality after pneumoperitoneum in a mouse model, *Cancer* 89 [2], pp. 262-266. URL: PM:10918154

[35] Stendel, R.; Scheurer, L.; Stoltenburg-Didinger, G.; Brock, M. und Mohler, H. (2003): Enhancement of Fas-ligand-mediated programmed cell death by taurolidine, *Anticancer Research* 23 [3B], pp. 2309-2314. URL: PM:12894508

[36] Pidgeon, G. P.; Harmey, J. H.; Kay, E.; Da Costa, M.; Redmond, H. P. und Bouchier-Hayes, D. J. (1999): The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease, *British Journal of Cancer* 81 [8], pp. 1311-1317. URL: PM:10604727

[37] Bedrosian, I.; Sofia, R. D.; Wolff, S. M. und Dinarello, C. A. (1991): Taurolidine, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis

factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells, Cytokine 3 [6], pp. 568-575. URL: PM:1790304

[38] Kilian, M.; Mautsch, I.; Braumann, C.; Schimke, I.; Guski, H.; Jacobi, C. A. und Wenger, F. A. (2003): Effects of taurolidine and octreotide on tumor growth and lipid peroxidation after staging-laparoscopy in ductal pancreatic cancer, Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 69 [4], pp. 261-267. URL: PM:12907136

[39] Opitz, I.; Veen, H. C.; Braumann, C.; Ablassmaier, B.; Fuhrer, K. und Jacobi, C. A. (2003): The influence of adhesion prophylactic substances and taurolidine/heparin on local recurrence and intraperitoneal tumor growth after laparoscopic-assisted bowel resection of colon carcinoma in a rat model, Surgical Endoscopy. URL: PM:12712383

[40] Braumann, C.; Ordemann, J.; Kilian, M.; Wenger, F. A. und Jacobi, C. A. (2003): Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer-bearing rats undergoing laparotomy, Clinical and Experimental Metastasis 20 [5], pp. 387-394. URL: PM:14524527

[41] Gutt, C. N.; Kim, Z. G.; Gessmann, T.; Lorenz, M. und Paolucci, V. (2000): Hepatic tumor spread of colorectal cancer in a laparoscopic animal model, Surgical Endoscopy 14 [5], pp. 448-451. URL: PM:10858469

[42] Weberschock TB; Kirsch SK; Jacobi CA; Lorenz M und Gutt CN (2003): Experimental application of taurolidine prevents metastatic tumor spread, .

[43] Shraye, D. P.; Lukoff, H.; King, T. und Calabresi, P. (2003): The effect of Taurolidine on adherent and floating subpopulations of melanoma cells, Anticancer Drugs 14 [4], pp. 295-303. URL: PM:12679734

[44] Petrovic, L.; Schlegel, K. A.; Ries, J.; Park, J.; Diebel, E.; Schultze-Mosgau, S. und Wiltfang, J. (2003): [In vitro effect of taurolidine on squamous cell carcinoma in the oral cavity], Mund Kiefer Gesichtschir. 7 [2], pp. 102-107. URL: PM:12664255

[45] Löffler und Petrides (1997): Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage. edition , Springer Verlag, ISBN: 3-540-59006-4.

[46] Fisher, B.; Fisher, E. R. und Feduska, N. (1967): Trauma and the localization of tumor cells, Cancer 20 [1], pp. 23-30. URL: PM:6016870

- [47] Wang, J. H.; Manning, B. J.; Wu, Q. D.; Blankson, S.; Bouchier-Hayes, D. und Redmond, H. P. (2003): Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF-kappa B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a beta 1 integrin-dependent mechanism, *Journal of Immunology* 170 [2], pp. 795-804. URL: PM:12517943
- [48] Rosman, C.; Westerveld, G. J.; van Oeveren, W.; Kooi, K. und Bleichrodt, R. P. (1996): Effect of intraperitoneal antimicrobials on the concentration of bacteria, endotoxin, and tumor necrosis factor in abdominal fluid and plasma in rats, *European Surgical Research* 28 [5], pp. 351-360. URL: PM:8880124
- [49] Lanfranccone, L.; Boraschi, D.; Ghiara, P.; Falini, B.; Grignani, F.; Peri, G.; Mantovani, A. und Pelicci, P. G. (1992): Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor [CSF], granulocyte-monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 [IL-1], and IL-6) and are activated and stimulated to grow by IL-1, *Blood* 80 [11], pp. 2835-2842. URL: PM:1280480
- [50] Leithauser, M. L.; Rob, P. M. und Sack, K. (1997): Pentoxifylline, cyclosporine A and taurolidine inhibit endotoxin-stimulated tumor necrosis factor-alpha production in rat mesangial cell cultures, *Experimental Nephrology* 5 [1], pp. 100-104. URL: PM:9052855
- [51] Dofferhoff, A. S.; Esselink, M. T.; Vries-Hospers, H. G.; van Zanten, A.; Bom, V. J.; Weits, J. und Vellenga, E. (1993): The release of endotoxin from antibiotic-treated *Escherichia coli* and the production of tumour necrosis factor by human monocytes, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31 [3], pp. 373-384. URL: PM:8486571
- [52] Watson, R. W.; Redmond, H. P.; Mc, Carthy J. und Bouchier-Hayes, D. (1995): Taurolidine, an antilipopolysaccharide agent, has immunoregulatory properties that are mediated by the amino acid taurine, *Journal of Leukocyte Biology* 58 [3], pp. 299-306. URL: PM:7665985
- [53] Wordemann, M.; Fandrey, J. und Jelkmann, W. (1998): Tumor necrosis factor-alpha production by human hepatoma cell lines is resistant to drugs that are inhibitory to macrophages, *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18 [12], pp. 1069-1075. URL: PM:9877451
- [54] Braumann, C.; Henke, W.; Jacobi, C. A. und Dubiel, W. (2004): The tumor-suppressive reagent taurolidine is an inhibitor of protein biosynthesis, *International*

Journal of Cancer 112 [2], pp. 225-230. URL: PM:15352034

Erklärung

„Ich, Marco Schönbeck, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Der Einfluss einer intravenösen Bolusapplikation versus einer Infusionstherapie von 1%, 2% und 3% Taurolidinlösung in der konventionellen Chirurgie auf das intra- und extraperitoneale Tumorwachstum bei Ratten.“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Marco Schönbeck Berlin, den 18.08.2005

Danksagungen

Danke,

Herrn Prof. Dr. med. C. A. Jacobi und Herrn Dr. Chris Braumann aus der Klinik für Allgemein-, Visceral, Gefäß- und Thoraxchirurgie der Charité Campus Mitte, für ihr stets persönliches und freundschaftliches Engagement, ihre Anregungen, gewissenhafte Unterstützung zur Planung und Durchführung der tierexperimentellen Versuche, bei der Auswertung der Ergebnisse und bei der Erstellung meiner Dissertation.

den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Tier-OP sowie dem Zelllabor, Frau Kirsten Führer und Frau Bettina Müller, für ihre tatkräftige Unterstützung und Einsatzbereitschaft bei den Operationen und Therapiezyklen sowie in der Ausbildung in den notwendigen Labortechniken, der Bereitstellung der chirurgischen Instrumentarien, der Tierpflege sowie bei der Lösung auftretender Probleme.

meinen Freunden und Studienkollegen für ihre Unterstützung bei der Verwirklichung der Dissertation und für das Verständnis, meine wissenschaftlichen und beruflichen Ziele zu realisieren.

meinen Eltern, die mir eine umfassende schulische Ausbildung und das Medizinstudium ermöglichten.

Lebenslauf

Persönliches	Geburtsdatum:	14.10.1977
	Geburtsort:	Berlin
	Familienstand:	Ledig
	Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulische Ausbildung	1984 – 1991	13. Grundschule Berlin
	1991 – 1997	Friedrich-List-Gymnasium Pankow, Berlin
		Abschluss: allgemeine Hochschulreife
	1997 – 1998	Zivildienst (Krankenpflege) Charité - Berlin
Universitäre Ausbildung	WS98 – SS05	Medizinstudium an der Humboldt-Universität zu Berlin
	06/2005	Ärztliche Prüfung
	30.06.2005	Approbation
Praktisches Jahr	2004	Innere Medizin - Park- Klinik Weißensee, Berlin
	2004	Chirurgie - Spital Aarberg, Schweiz
	2004/05	Kinderheilkunde - DRK Kliniken Westend, Berlin

Publikationen

Braumann C, Schoenbeck M, Menenakos C, Kilian M, Jacobi CA, Effects of increasing doses of a bolus injection and an intravenous long-term therapy of

taurolidine on subcutaneous (metastatic) tumor growth in rats, Clinical and Experimental Metastasis, Volume 22, Issue 1, Jan 2005, Pages 77 - 83